

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Química

Thiago Coimbra Pimenta

**IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DE DENGUE
UTILIZANDO ELETRODOS IMPRESSOS DE GRAFITE REVESTIDOS COM
FILMES POLIMÉRICOS DERIVADOS DO ÁCIDO 4-AMINOFENILACÉTICO**

Diamantina

2017

Thiago Coimbra Pimenta

**IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DE DENGUE
UTILIZANDO ELETRODOS IMPRESSOS DE GRAFITE REVESTIDOS COM
FILMES POLIMÉRICOS DERIVADOS DO ÁCIDO 4-AMINOFENILACÉTICO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira
Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Luís Thomasini

Diamantina

2017

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

P644i Pimenta, Thiago Coimbra.
2017 Imunossensor impedimétrico para diagnóstico de dengue utilizando eletrodos impressos de grafite revestidos com filmes poliméricos derivados do ácido 4-aminofenilacético / Thiago Coimbra Pimenta – Diamantina, 2017.
80 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira
Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Luís Thomasini

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química) –Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Imunossensor. 2. Ácido 4-aminofenilacético. 3. Filmes poliméricos. 4. NS1. 5. Dengue. I. Ferreira, Lucas Franco. II. Thomasini, Ronaldo Luís. III. Título.

CDD 547.3

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

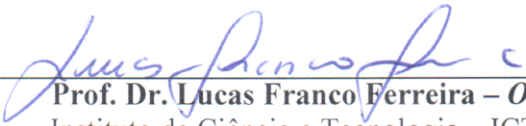
Thiago Coimbra Pimenta

**IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO DE DENGUE
UTILIZANDO ELETRODOS IMPRESSOS DE GRAFITE REVESTIDOS COM
FILMES POLIMÉRICOS DERIVADOS DO ÁCIDO 4-AMINOFENILACÉTICO**

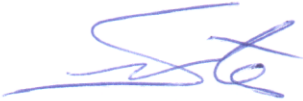
Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira
Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Luís Thomasini

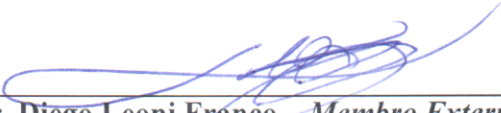
Aprovada em 28/04/2017.



Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira – Orientador
Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT/UFVJM



Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos – Membro
Faculdade de Ciências Biológicas da Saúde – FCBS/UFVJM



Prof. Dr. Diego Leoni Franco – Membro Externo ao PPGQ
Instituto de Química – IQ/UFU

Diamantina-MG

2017

Aos meus pais, pela criação e pelos valores ensinados, dedico
esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Enfim, depois de 2 anos e meio, findo mais um desafio em minha vida. Mesmo executando grande parte desse trabalho sozinho, não posso deixar de agradecer as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão dele.

Ao Professor Lucas Franco Ferreira, pela orientação e pelos ensinamentos durante o mestrado.

Aos Professores do Programa de Mestrado em Química, pelos ensinamentos e oportunidade de aprender, contribuindo para minha formação.

Ao Professor Ronaldo Thomasini, pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus colegas do grupo GENAp, pelo companheirismo no laboratório, pelos momentos de descontração e de troca de conhecimentos.

À Cátia Cruz Santos, por sempre ter me ajudado nos momentos de dificuldade e por me fazer persistir nessa caminhada árdua.

Aos meus colegas do ICT, por me aturarem e pelo apoio e incentivo. Em especial, agradeço a Breno, Carlos Magno e Ilva, pela ajuda e apoio durante esse período.

Aos meus amigos, que mesmo distantes torceram por mim.

Ao meu amigo Leandro, que mesmo longe me incentivava e não me deixava desistir, sempre com palavras de apoio e motivação.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem nas minhas decisões, acreditando sempre na minha vitória.

Aos meus irmãos, por torcerem por mim, emanando sempre energias positivas.

À Deus, pois sem Ele nada é possível.

Enfim, agradeço a todos por tudo!

“A persistência é o menor caminho do êxito”
(Charles Chaplin)

RESUMO

A Dengue é uma doença infecciosa viral de transmissão vetorial pelo mosquito *Aedes aegypti*, cujo controle tem se mostrado de solução complexa. Além disso, o diagnóstico clínico é difícil de ser realizado, principalmente na fase aguda da doença, em que os sintomas são muito similares aos de outras infecções febris agudas, e por essa razão o desenvolvimento de métodos de detecção mais efetivos para o seu controle, ganha relevância. Métodos moleculares estão sendo cada vez mais utilizados para o diagnóstico precoce por serem mais rápidos e sensíveis. Nesse sentido, o uso de biossensores ganha relevância por serem dispositivos versáteis, de fácil construção e utilização, sensíveis e seletivos. Combinado com o uso de polímeros modificadores da superfície transdutora, o que favorece a etapa de imobilização das biomoléculas, os biodispositivos assim construídos se mostram mais sensíveis devido à compatibilidade das características do elemento biológico e do filme polimérico. Desta forma, este trabalho visou desenvolver um imunossensor impedimétrico para diagnóstico de Dengue utilizando eletrodos impressos de grafite (EI) funcionalizados com filmes poliméricos derivados do ácido 4-aminofenilacético (4-AFA). O imunossensor baseou-se na interação específica entre o antígeno da Dengue, a proteína NS1, e os anticorpos *anti*-NS1. No estudo de caracterização por voltametria cíclica (VC) da plataforma funcionalizada, observou-se que o filme polimérico formado apresentou dois picos de oxidação em +0,17 e +0,35 V em meio de solução de ácido sulfúrico 0,50 M, o que mostra sua adsorção e eletroatividade na superfície do eletrodo. Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) mostraram maior resistência à transferência eletrônica do EI modificado com o filme polimérico quando comparado ao EI sem modificação, corroborando o estudo anterior. Para o estudo de melhor concentração de NS1 para imobilização, verificou-se que 1,00 ng/mL apresentou melhor sinal analítico, devido à diminuição nas interações que ocorre entre os antígenos. O tempo de imunorreação entre antígeno (Ag) e anticorpo (Ac) também foi estudado, no qual observou-se que o tempo ideal para que ocorra a imunocomplexação foi de 20 minutos. Em seguida, foi realizado estudo de diluição dos soros positivos e negativos por EIE, no qual foi possível observar, para o soro positivo, que quanto mais diluído o soro maior foi o valor de R_{ct} encontrado. O soro negativo também apresentou sinal analítico, provavelmente devido à presença de anticorpos não específicos, porém, o sinal gerado apresentou valores mais próximos do sinal da NS1, mostrando a seletividade da plataforma proposta. O estudo foi repetido em eletrodo sem modificação a fim de verificar a importância do filme polimérico na construção do biossensor. Observou-se que quando a NS1 é imobilizada ao eletrodo não modificado, o R_{ct} aumentou muito pouco quando comparado ao eletrodo modificado com o filme derivado do 4-AFA, o que mostra a eficiência e sensibilidade da plataforma proposta.

Palavras chave: Imunossensor, ácido 4-aminofenilacético, filmes poliméricos, NS1, Dengue.

ABSTRACT

Dengue is a viral infectious disease transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito, whose control has shown a complex solution. In addition, the clinical diagnosis is difficult to perform, especially in the acute phase of the disease, in which the symptoms are very similar to other acute febrile infections, and for this reason the development of more effective detection methods for its control gains relevance. Molecular methods are being increasingly used for early diagnosis because they are faster and more sensitive. In this sense, the use of biosensors gains relevance because they are versatile devices, of easy construction and use, sensitive and selective. Combined with the use of transducing surface modifying polymers, which favors a stage of immobilization of the biomolecules, the biodevices constructed in this way are more sensitive due to the compatibility of the biological element characteristics and the polymer film. Thus, this work aimed to develop an impedimetric immunosensor to Dengue diagnose using screen-printed electrode (SPE) functionalized with polymer films derived from 4-aminophenylacetic acid (4-APA). The immunosensor was based on the specific interaction between Dengue antigen, NS1 protein, and *anti*-NS1 antibodies, IgG e IgM. In characterization study by cyclic voltammetry (CV) of the functionalized platform, it has been observed that the polymer film shown two oxidation peaks in +0.17 and +0.35 V in 0,5 M sulfuric acid solution medium, which shows its adsorption and electroactivity at the SPE surface. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements has shown a higher charge transfer resistance to the polymer film modified SPE when compared to the non-modified SPE, corroborating the previous study. For the study of NS1 best concentration to immobilization, it has been verified that 1,00 ng/mL presented better analytical signal, due to the decrease of the interactions that occur between the antigens. Immunoreaction time between antigens (Ag) and antibody (Ab) has also been studied, in which it has been observed that the ideal time for immunocomplexation was 20 minutes. Afterwards, a positive and negative sera dilution study was carried out by EIE, in which it has been possible to observe, for the positive serum, that the more diluted the serum the greater the R_{ct} found. The negative serum also presented analytical signal, probably due to the presence of non-specific antibodies, however, the generated signal presented values closer to the NS1 signal, showing the selectivity of the proposed platform. The study was repeated in electrode without modification in order to verify the importance of the polymeric film in the biosensor construction. It was observed that when NS1 is immobilized to the non-modified electrode, R_{ct} increases very little when compared to the 4-AFA derived film modified electrode, which shows the efficiency and sensitivity of the proposed platform.

Keywords: Immunosensor, 4-aminophenylacetic acid, polymer films, NS1, Dengue.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Áreas onde há risco de transmissão da dengue em nível global..... | 19 |
| Figura 2: Número de casos de dengue no Brasil no período de 1990 a 2016. | 23 |
| Figura 3: Representação esquemática do genoma do vírus dengue. | 25 |
| Figura 4: Representação esquemática dos níveis de anticorpos IgM e IgG e antígeno NS1 durante as respostas primária e secundária aos DENV. | 28 |
| Figura 5: Representação esquemática dos componentes de um biossensor eletroquímico..... | 31 |
| Figura 6: Representação esquemática de um imunossensor. | 33 |
| Figura 7: Principais estratégias de imobilização: (a) adsorção física, (b) ligação covalente, (c) ligação cruzada e (d) encapsulamento. | 35 |
| Figura 8: Estrutura química do ácido 4-aminofenilacético. | 37 |
| Figura 9: Eletrodo impresso de grafite obtido da DroSens®. Dimensões: 3,4 x 1,0 x 0,05 cm (comprimento x largura x altura). | 41 |
| Figura 10: VCs consecutivos do EI em solução 0,50 M de ácido sulfúrico. Número de ciclos = 5; $\nu = 50$ mV/s. | 45 |
| Figura 11: VCs consecutivos do 4-AFA (10 ciclos) em solução 0,50 M de H ₂ SO ₄ , na faixa de potencial de -0,20 a +0,90 V. $\nu = 50$ mV/s. [4-AFA] = 2,50 mM. (---) 1º ciclo de potencial. | 46 |
| Figura 12: VC obtidos em solução de H ₂ SO ₄ 0,50 M. $\nu = 100$ mV/s para: (---) EI e (—) EI/poli(4-AFA). | 47 |

Figura 13: VCs referente ao (---) EI e (—) EI/poli(4AFA) em: (A) solução 5,00 mM de ferro/ferricianeto de potássio contendo KCl 0,10 M e (B) solução de KCl 0,10 M. $v = 100 \text{ mV/s}$.

..... 48

Figura 14: Diagramas de Nyquist (A) e Bode (B) dos espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para: (○) EI e (□) EI/poli(4-AFA). As linhas sólidas representam a simulação dos dados experimentais para um circuito equivalente. Amplitude 10 mV. Intervalo de frequência: 10^5 a 10^{-2} Hz. $E_{\text{app}} = \text{OCP}$. 50

Figura 15: Circuito elétrico equivalente de Randles utilizado para simulação dos dados experimentais de EIE. 51

Figura 16: Diagramas de Nyquist (A - H) e Bode (A' - H') dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para o EI/poli(4-AFA) nas concentrações de NS1 de: (A) 6 mg/mL; (B) 3 mg/mL; (C) 1 mg/mL; (D) 0,1 mg/mL; (E) 10 $\mu\text{g/mL}$; (F) 1 $\mu\text{g/mL}$; (G) 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e (H) 1 ng/mL. Amplitude 10 mV. Intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. $E_{\text{app}} = \text{OCP}$ 54

Figura 17: Diagrama de Nyquist dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para o EI/poli(4-AFA)/NS1 utilizando tampão HBS-EP (□) com *Tween* 20 e (○) sem *Tween* 20 nas etapas de lavagem. Onde: [NS1] = 1,0 ng/mL. Amplitude 10 mV. Intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. $E_{\text{app}} = \text{OCP}$ 57

Figura 18: Diagrama de Nyquist dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para o (□) EI/poli(4-AFA) e para (○) EI/poli(4-AFA)/NS1. Onde: [NS1] = 1,0 ng/mL. Amplitude 10 mV. Intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. $E_{\text{app}} = \text{OCP}$ 57

Figura 19: Relação da ΔR_{ct} vs tempo de imunorreação sobre o biossensor. 58

Figura 20: Diagramas de Nyquist (A) e Bode (B) dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para o EI/poli(4-AFA)/NS1 para as seguintes diluições do soro positivo (▽) onde temos: (a) 1:20; (b) 1:40; (c) 1:80; (d)

1:160; (e) 1:320; (f) 1:640; (g) 1:1280 e (o) EI/poli(4-AFA)/NS1. As linhas sólidas representam a simulação dos dados experimentais para um circuito equivalente. Amplitude 10 mV; intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. [NS1] = 1 ng/mL. E_{app} = OCP.60

Figura 21: Estrutura dos anticorpos IgG e IgM.61

Figura 22: Diagrama de Nyquist dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para o EI/poli(4-AFA)/NS1 para as seguintes diluições dos soros negativos (\diamond) onde temos: (a) 1:20; (b) 1:40; (c) 1:80; (d) 1:160; (e) 1:320; (f) 1:640; (g) 1:1280 e (o) EI/poli(4-AFA)/NS1. As linhas sólidas representam a simulação dos dados experimentais para um circuito equivalente. Amplitude 10 mV; intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. [NS1] = 1 ng/mL. E_{app} = OCP.63

Figura 23: Resposta dos valores de resistência a transferência de carga para o imunossensor em função da diluição de soros positivos e negativos para a dengue. Onde tem-se a resposta para: (∇) soros positivos; (\diamond) soros negativos e (o) NS1.65

Figura 24: Diagramas de Nyquist dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para: (Δ) EI; (\circ) EI/NS1 e (\square) EI/NS1/Soro Positivo. As linhas sólidas representam a simulação dos dados experimentais para um circuito equivalente. Amplitude 10 mV; intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. Diluição soro: 1:160. [NS1] = 1 ng/mL. E_{app} = OCP.67

Figura 25: Diagramas de Nyquist dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para: (o) EI/poli(4-AFA)/NS1; (∇) EI/poli(4-AFA)/NS1/Soro Positivo e (\diamond) EI/poli(4-AFA)/NS1/Soro Negativo. As linhas sólidas representam a simulação dos dados experimentais para um circuito equivalente. Amplitude 10 mV; intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. E_{app} = OCP.68

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Parâmetros obtidos a partir dos resultados de simulação de EIE para os EI e EI/poli(4-AFA)..... | 52 |
| Tabela 2: Parâmetros obtidos a partir de simulação EIE para o estudo de diluição do soro positivo. [NS1] = 1 ng/mL..... | 61 |
| Tabela 3: Comparação entre os valores de R_{ct} para resposta do imunossensor frente a mostras de soros positivas e negativas para Dengue..... | 64 |
| Tabela 4: Estudos reportados na literatura para o diagnóstico da dengue, relacionando o tipo do transdutor com o analito, limite de detecção e faixa de trabalho. | 66 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| 4-AFA | Ácido 4-aminofenilacético |
| A _c | Anticorpos |
| A _g | Antígenos |
| C | Capacitância |
| DC | Dengue clássica |
| FHD | Febre hemorrágica da dengue |
| Funasa | Fundação Nacional de Saúde |
| Q _{dl} | Capacitância da dupla camada |
| EI | Eletrodo impresso de grafite |
| EIE | Espectroscopia de impedância eletroquímica |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> |
| E _{p,a} | Potencial de pico anódico |
| E _{p,c} | Potencial de pico catódico |
| I _{p,a} | Corrente de pico anódica |
| I _{p,c} | Corrente de pico catódico |
| IUPAC | União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, <i>International Union of Applied Chemistry</i> |
| M | Molar |
| MS | Ministério da Saúde |
| mV/s | Milivolts por segundo (velocidade de varredura) |
| NS1 | Proteína não estrutural do vírus da Dengue, do inglês, <i>non-structural protein 1</i> |
| OCP | Potencial de circuito aberto, do inglês <i>open circuit potencial</i> |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OPAS | Organização Pan-Americana de Saúde |
| PEAa | Plano de Erradicação do <i>Aedes aegypti</i> |
| PIACD | Plano de Intensificação de Controle da Dengue |
| PNCD | Plano Nacional de Controle da Dengue |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase, do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> |
| poli(4-AFA) | Filmes poliméricos derivados do ácido 4-aminofenilacético |
| R _{tc} | Resistência a transferência de carga |

| | |
|--------------|--|
| SE | Semana epidemiológica |
| V | Volts |
| VC | Voltametria cíclica |
| W | Impedância de Warburg |
| Z' | Componente real de impedância (resistiva) |
| Z'' | Componente imaginária de impedância (capacitiva) |
| ΔE_p | Diferença entre os potenciais de pico |
| ϕ | Ângulo de fase |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 19 |
| 2.1 – Dengue | 19 |
| 2.1.1 - Histórico: Epidemiologia no mundo e no Brasil | 20 |
| 2.1.2 - Agente etiológico | 24 |
| 2.1.3 - Proteína NS1 | 25 |
| 2.1.4 - Diagnóstico laboratorial | 27 |
| 2.2 – Biossensores | 30 |
| 2.2.1 - Imunossensores | 32 |
| 2.3 – Filmes Poliméricos | 34 |
| 2.4 – Técnicas de imobilização | 35 |
| 2.5 – Ácido 4-aminofenilacético | 37 |
| 3. OBJETIVOS | 39 |
| 3.1 – Objetivo geral | 39 |
| 3.2 – Objetivos específicos | 39 |
| 4. METODOLOGIA | 41 |
| 4.1 – Instrumentação e soluções | 41 |
| 4.2. Procedimento Experimental | 42 |
| 4.2.1 – Eletropolimerização do 4-AFA | 42 |
| 4.2.2 – Propriedades eletroquímicas do poli(4-AFA) | 42 |
| 4.2.3 – Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) | 43 |
| 4.2.4 – Imobilização antígeno NS1 e detecção dos anticorpos anti-NS1 | 43 |
| 4.2.5 – Estudo do tempo de imunorreação | 44 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 5.1 - Eletropolimerização do 4-AFA por VC | 45 |
| 5.2 – Comportamento eletroquímico do poli(4-AFA) | 47 |
| 5.3 – Propriedades de transferência de carga do poli(4-AFA) | 47 |
| 5.4 – Análises de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 5.5 – Imobilização do antígeno NS1 | 53 |
| 5.5.1 – Influência da concentração de NS1 imobilizado..... | 53 |
| 5.5.2 – Otimização do tempo de imunorreação..... | 58 |
| 5.5.3 - Efeito da diluição dos soros positivos na sensibilidade do imunossensor. | 59 |
| 5.5.4 – Efeito da diluição das amostras de soros negativos | 62 |
| 5.5.5 – Importância do filme poli(4-AFA) na imobilização de biomoléculas | 65 |
| 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 69 |
| REFERÊNCIAS | 71 |

1. INTRODUÇÃO

A Dengue é uma doença viral transmitida aos humanos através da picada do mosquito *Aedes aegypti*. Este tem sido um fenômeno recorrente nos países tropicais e subtropicais nas últimas décadas. Em 2013, a maioria dos países latino-americanos relatou mais de dois milhões de casos de Dengue e um aumento no número de casos de febre hemorrágica e de óbitos.

O vírus da Dengue é endêmico em pelo menos 112 países em todo o mundo (DIAS, A. C. M. S. *ET AL.*, 2013), incluindo o Brasil, sendo caracterizada como a doença mais frequente transmitida por mosquitos. A taxa de mortalidade de Dengue hemorrágica, na maioria dos países, é – em média – de 5%, principalmente entre crianças e adolescentes. Em vários países, esse vírus é a principal causa de hospitalização e morte. Sendo assim, existe uma necessidade urgente de diagnósticos rápidos e vacinas profiláticas, visando à melhoria da qualidade de vida da população residente nas áreas de risco.

Existem vários tipos de ensaios para detectar o vírus da Dengue, no qual as técnicas tradicionais de diagnóstico do vírus são: isolamento em cultura de células, testes sorológicos, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), e testes rápidos, como o imunocromatográfico (DARWISH, ALIAS E KHOR, 2015; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Informação Geral: Dengue, 2017). Os métodos de PCR e isolamento viral são bem exatos e sofisticados, mas requerem equipamentos avançados e infraestrutura, bem como pessoas qualificadas para utilização do equipamento, o que torna seu uso restrito.

O teste ELISA é o método de diagnóstico mais utilizado para detecção do vírus da Dengue. Este é um método relativamente demorado, além do fato de que se costuma concentrar um lote mínimo de amostras para justificar o lançamento de uma rotina de testes e, portanto, na prática, não é um teste com resultado liberado com rapidez.

A possibilidade de utilização de testes rápidos e sensíveis para diagnóstico da Dengue, principalmente, aqueles de fácil execução, que podem ser utilizados em ambulatórios, unidades móveis e *in loco* é uma proposta bastante atrativa para a sociedade em geral. Sendo assim, dispositivos como os biossensores podem ser idealizados e utilizados para este fim, de modo a usar equipamentos de pequenas dimensões e com baixa intervenção do operador, mostrando-se como uma ferramenta alternativa e de interessante ao diagnóstico *in loco* da Dengue, bem como de outras doenças infecciosas.

Dentre os diversos tipos de biossensores, os eletroquímicos se destacam como o caminho mais viável para a análise de baixas concentrações de substâncias na presença de

interferentes, o que requerer alta seletividade do método. Uma outra vantagem é a possibilidade de miniaturização do processo de análise, que pode ser realizada com facilidade. Além disto, combinando o uso das propriedades dos polímeros com as de um componente biológico, é possível desenvolver um sistema bioeletrônico para utilização em testes específicos para doenças infecciosas e parasitárias.

Polímeros condutores, sob a forma de filmes finos depositados na superfície do eletrodo, representam materiais promissores para aplicações em sensores (MCQUADE, PULLEN E SWAGER, 2000) e biossensores (ADHIKARI E MAJUMDAR, 2004; IVANOV, TSAKOVA E MIRSKY, 2006) onde uma tendência recente nesta área é o uso de polímeros condutores funcionalizados (JÚNIOR, SILVA E GUINESI, 2004), o que pode garantir maior estabilidade/durabilidade no processo de imobilização das biomoléculas, diminuindo efeitos como os de lixiviação e perda da resposta do biossensor.

Sendo assim, a proposta do trabalho é desenvolver um imunossensor impedimétrico utilizando eletrodo impresso de grafite modificado com filme polimérico derivado do ácido 4-aminofenilacético para aplicação no diagnóstico de Dengue.

Tal estudo baseia-se no desenvolvimento e construção de um biossensor miniaturizado e específico para detecção e quantificação de anticorpos de classe IgG e IgM contra o vírus da dengue. O dispositivo deve apresentar ainda características como: alta sensibilidade e seletividade, baixo custo de produção e facilidade de aplicação na utilização do produto final.

A imobilização da NS1 é uma articulação de reconhecimento, pois quando imobilizados, pode-se detectar e quantificar os anticorpos da doença, através do monitoramento da interação antígeno-anticorpo, resultante da reação. Além disto, a proposta prevê o reconhecimento destes anticorpos em amostras reais de pacientes diagnosticados com dengue, bem como sadios.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

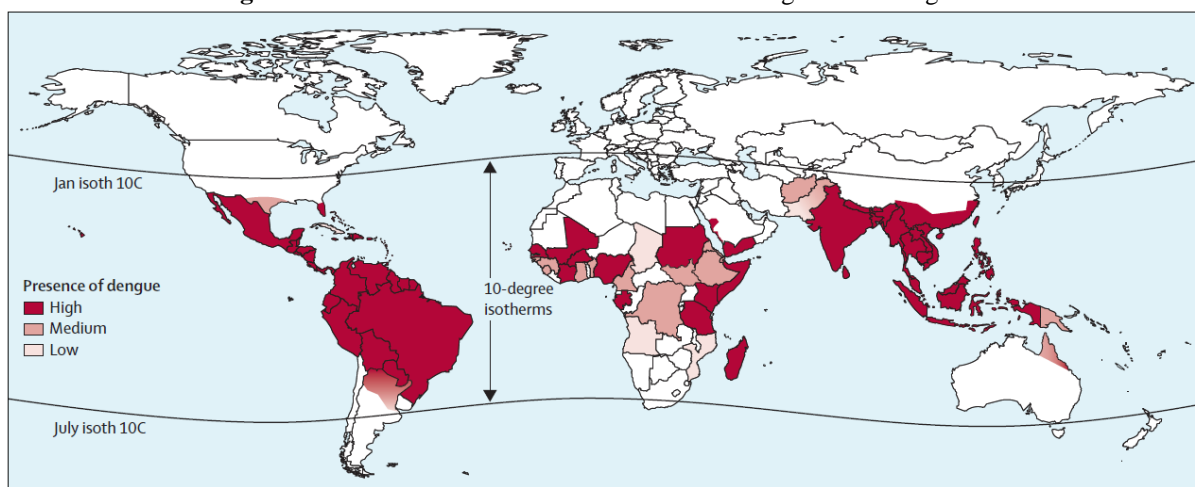
2.1 – Dengue

A dengue é uma doença infecciosa viral conhecida mundialmente, de evolução geralmente benigna e transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o principal vetor o *Aedes aegypti*, cujo controle se mostra de solução complexa e, por essa razão, o desenvolvimento de modelos mais efetivos para o seu controle ganha relevância em diversas partes do mundo, especialmente no Brasil (SANTOS, 2009; SANTOS E AUGUSTO, 2011).

Nas últimas décadas, a dengue tem sido considerada como uma das doenças de maior impacto na saúde pública em todo o mundo. Isso porque ela ressurge como uma potencial pandemia global, posto que, no mundo, estima-se que mais de dois bilhões e meio de pessoas vivam em áreas com a presença do vetor, apresentando-se em condições favoráveis à transmissão do vírus (SANTOS E AUGUSTO, 2011). Desde o início dos anos 70, a Organização Mundial da Saúde (OMS) está envolvida, de maneira bastante ativa, no desenvolvimento e na promoção de estratégias de tratamento e controle da doença (ORGANIZATION, 1997; BRAGA E VALLE, 2007).

A presença do mosquito *Aedes aegypti* no mundo ocorre em uma ampla região do planeta, sobretudo nos países de clima tropical e subtropical, em torno da linha do Equador e abaixo dela, onde se encontra a maioria dos países pobres (SANTOS, 2009). O mapa da OMS, apresentado na Figura 1 mostra as áreas vulneráveis à dengue em todo o planeta.

Figura 1: Áreas onde há risco de transmissão da dengue em nível global.



Fonte: GUSMAN e HARRIS, 2015.

De acordo com o Ministério da Saúde (MS), as manifestações clínicas da dengue são amplas. Elas incluem desde quadros oligossintomáticos (poucos sintomas), podendo mostrar-se com sintomas clássicos, até formas hemorrágicas. A primeira manifestação é a febre, geralmente alta (39 a 40 °C) de início abrupta, associada à cefaleia (dor de cabeça), adinamia (fraqueza muscular), mialgias (dores musculares), artralguas (dores nas articulações) e dor retro-orbitária (dores atrás dos olhos). Anorexia, náuseas, vômitos e disenteria podem ser observados por dois a seis dias. Alguns pacientes podem evoluir para as formas graves da doença e passam a apresentar sinais de alarme da dengue, como o surgimento de manifestações hemorrágicas espontâneas e plaquetopenia (plaquetas $<100.000/\text{mm}^3$) (SOUZA, 2008; DIAS, 2015).

Segundo Silva e colaboradores (2011) a dengue manifesta-se, clinicamente, sob duas formas principais: a dengue clássica (DC) e a forma hemorrágica, ou febre hemorrágica de dengue (FHD), esta última ocorre em casos com extravasamento de plasma, hemorragia severa e comprometimento de órgãos (SILVA ET AL., 2011).

2.1.1 - Histórico: Epidemiologia no mundo e no Brasil

Desde a segunda metade do século XX, alguns dos maiores problemas de saúde pública têm sido a reemergência de epidemias de DC e a emergência da FHD. Os motivos desses problemas foram as mudanças demográficas e o intenso fluxo migratório rural-urbano, que geraram um crescimento desordenado nas cidades, ausência de boas condições de saneamento básico e, como consequência, a proliferação do vetor. Desta forma, a incidência de dengue tem aumentado nas últimas décadas (BRAGA E VALLE, 2007).

Até a década de 70, as epidemias de FHD foram registradas somente em nove países. Em 1995, esse número havia aumentado mais de quatro vezes. Em 1950 eram notificados, em média, 900 casos de FHD por ano. No período de 1990 a 1998 passaram de 500 mil. Em 1998, um total de 1,2 milhões de casos de DC e FHD foram reportados à OMS, com 15.000 mortes (BRAGA E VALLE, 2007; BARRETO E TEIXEIRA, 2008).

Durante o período de 2000 a 2006, foram reportados cerca de 545 mil casos de dengue em 44 países (GÓMEZ-DANTÉS E WILLOQUET, 2009). A OMS estima que cerca de 50 a 100 milhões de novos casos de infecção pelo vírus da dengue ocorram pelo mundo todo ano. Mais de 100 países têm informado a presença da doença em suas populações (na África, nas Américas, no leste Mediterrâneo, Sudeste da Ásia e Pacífico Ocidental) (WHITEHEAD ET AL., 2007; SANTOS E AUGUSTO, 2011).

Segundo Santos (2009) as epidemias da dengue são mundialmente reconhecidas como sendo explosivas, de alta magnitude e com letalidade elevada no Sudeste Asiático, pois, por muito tempo, a DC e a FHD constituíram problemas restritos aos países do Sudeste Asiático e da Oceania devido, principalmente, ao programa de erradicação do *Aedes aegypti* nas Américas para controle da febre amarela urbana nas décadas de 1950 e 1970 (BRAGA E VALLE, 2007). Somente a partir da década de 1980, a doença disseminou-se pelas Américas, após a interrupção desse programa no final dos anos 70 (GUBLER, 2002).

De acordo com a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS) (2003), cerca de 483 mil casos de dengue foram notificados nas Américas, no ano de 2003, dos quais, aproximadamente, dez mil eram de dengue hemorrágica. Mais de 250 mil casos foram provenientes do continente Sul-americano. Enquanto que, no Brasil, segundo a Fundação Nacional de Saúde (Funasa) (1999), a dengue apresenta um padrão sazonal, com maior incidência de casos nos primeiros cinco meses do ano, período mais quente e úmido, típico dos climas tropicais.

Segundo Braga e Valle (2007), a dengue surgiu no Brasil no ano de 1846, mas foi a partir 1986 que a dengue adquiriu importância epidemiológica, quando apareceu subitamente a epidemia no estado do Rio de Janeiro e a circulação do sorotipo DENV-1, que logo alcançou a região Nordeste. Desta forma, a dengue se tornou endêmica no Brasil, intercalando-se epidemias, geralmente associadas à introdução de novos sorotipos, em áreas anteriormente ílesas (SCHATZMAYR, 2000; BARBOSA JR *ET AL.*, 2002).

Como relatado pela Funasa (1999), no período entre 1986 e 1990, as epidemias de dengue se restringiram a alguns estados da região Sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais) e Nordeste (Pernambuco, Alagoas, Ceará e Bahia). Mas durante a década de 90, houve agravamento do quadro epidemiológico e, nesse período, houve uma rápida dispersão do vírus em todo o território nacional, principalmente, a partir de 1994, quando se detectou a presença dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 em 20 dos 27 estados brasileiros (SANTOS, 2009).

Posteriormente, em 2001, o sorotipo DENV-3 foi introduzido no Rio de Janeiro, (NOGUEIRA *ET AL.*, 2001) tendo sido detectado também no estado de Roraima. Já em 2007, o DENV-3 circulava em 25 das 27 unidades federais (BRAGA E VALLE, 2007). Em 2002, foram registrados cerca de 800 mil casos de dengue no Brasil, o que corresponde a 80% dos casos de toda a América no mesmo ano, com 150 óbitos por FHD. No mesmo ano, registrou-se transmissão de dengue em todos os estados, exceto em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, onde os casos detectados eram importados (BARRETO E TEIXEIRA, 2008).

Segundo a OPAS (2008) entre os anos de 2003 a 2005, houve um decréscimo no número de casos notificados de dengue, no estado do Rio de Janeiro (9.242, 2.694 e 2.580, respectivamente), sendo considerados como interepidêmicos. Porém, a partir do ano de 2006, o número de casos de dengue aumentou, sendo notificados 31.054 casos, (61 óbitos), considerado o maior da história, ficando atrás apenas do ano de 2002, quando o país vivenciou a pior epidemia da doença. Desde 2003 até maio de 2007, o DENV-3 foi o único sorotipo isolado. Contudo, a partir do mês abril de 2007, observou-se a reemergência do DENV-2. Este sorotipo causou uma grave epidemia no ano de 2008 com um total de 259.392 casos dos 734.384 casos notificados no Brasil (LIMA, 2009).

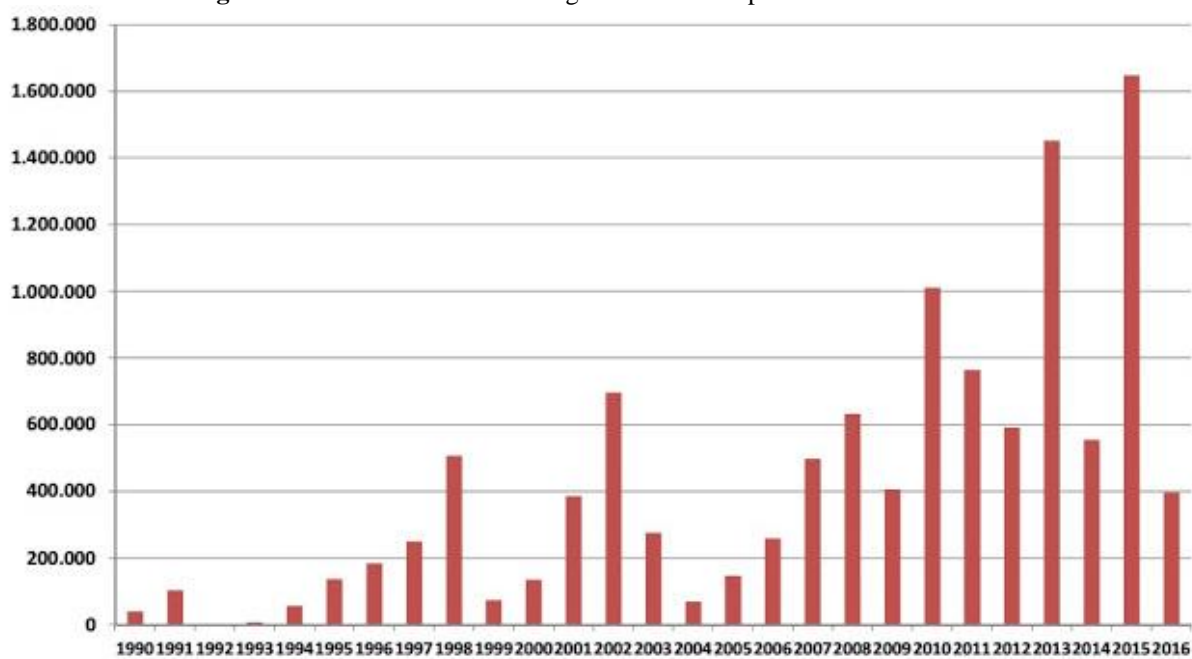
De acordo com o Ministério da Saúde (2014), na última década foram registrados cerca de cinco milhões de casos de dengue no Brasil, com cerca de oitocentas mortes, sendo quase um milhão de casos somente no ano de 2010, representando um aumento de mais de 150% em relação ao mesmo período de 2009. Desse total, 2.271 casos foram de febre hemorrágica da dengue, com 367 óbitos. A região sudeste foi a que notificou o maior número de casos (51,2%) (DIAS *ET AL.*, 2010). Em 2013, o número de casos registrados foi quase três vezes maior que o número de casos em 2012.

A partir de janeiro de 2014, o MS passou a utilizar a nova classificação da dengue, determinada pela OMS desde 2009. As denominações referentes à dengue clássica, febre hemorrágica da dengue, dengue com complicação e síndrome de choque da dengue deixaram de ser utilizadas. Atualmente, são usadas as seguintes denominações: dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave. Essa nova denominação se mostrou mais sensível para captar os casos graves e, com isso, contribui para melhorar o diagnóstico dos pacientes, para uma possível redução da letalidade por dengue e uma maior aproximação entre vigilância epidemiológica e assistência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Em 2015, segundo o Ministério da Saúde (2017), foram registrados 1.677.013 casos notificados de dengue e em 2014, 583.221 casos por 100 mil habitantes. Em 2016, até a Semana Epidemiológica (SE) 51 (3/1/2016 a 24/12/2016), foram registrados 1.496.282 casos notificados de dengue no país, com uma incidência de 731,9 casos/100 mil habitantes. Neste mesmo ano, até a SE 51, foram confirmados 844 casos de dengue grave e 8.237 casos de dengue com sinais de alarme. No mesmo período de 2015, foram confirmados 1.706 casos de dengue grave e 21.591 casos de dengue com sinais de alarme. A região com maior número de casos confirmados de dengue grave e de dengue com sinais de alarme foi a região Sudeste, com 439 e 3.785 casos, respectivamente.

Foram confirmados 629 óbitos por dengue, representando uma proporção de 6,9% dos casos graves ou com sinais de alarme. No mesmo período de 2015 foram confirmados 984 óbitos, representando uma proporção de 4,2% dos casos graves ou com sinais de alarme (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A Figura 2 mostra o número de casos de dengue no Brasil entre o período de 1990 a 2016.

Figura 2: Número de casos de dengue no Brasil no período de 1990 a 2016.



Fonte: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue> Acesso: 08 fev. 2017.

Diante deste cenário epidemiológico, a dengue tem sido objeto de uma das maiores campanhas de saúde pública já realizada no país. O combate ao *Aedes Aegypti* foi institucionalizado no Brasil, de forma sistematizada, a partir do século XX. Eficientes programas contra o vetor foram implementados em todos os países latino-americanos, entre o final da década de 1940 e a década de 1950 (LÖWY, 1999; BRAGA E VALLE, 2007).

Os programas de controle de doenças transmitidas por vetores, no mundo, dentre eles o da dengue, de modo geral, são orientados a adotarem inseticidas químicos como a principal medida de controle vetorial. No Brasil, em 1990, a Funasa foi criada e passou a ser responsável pela coordenação das ações de controle da dengue (SANTOS, 2009).

A partir de 1996, período no qual ocorre aumento em torno de 276% no número de casos se comparado o ano de 1996 e com o de 1998, conforme apresentado no gráfico da Figura 2, o MS elaborou alguns planos de controle da dengue, um dos primeiros foi o Plano de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa), cuja principal preocupação residia nos casos de dengue

hemorrágica, que pode levar à morte. Em julho de 2001, a Funasa abandonou oficialmente a meta de erradicar o *Aedes aegypti* do país e passou a trabalhar com o objetivo de controlar o vetor. Foi implantado então o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD), que focalizou as ações em municípios com maior transmissão da doença, considerados prioritários, escolhidos entre aqueles com infestação por *Aedes aegypti* e registro de transmissão de dengue nos anos de 2000-2001 (BRAGA E VALLE, 2007).

Percebe-se na Figura 2 que no período compreendido entre os anos de 1994 a 1998; 1999 a 2002 e de 2004 a 2007 ocorre um aumento gradativo no número de casos notificados, com um acréscimo em torno de 933% neste último intervalo. Nota-se também, que após o pico máximo de número de casos notificados, há uma redução significativa de pessoas infectadas com o vírus da Dengue. Isso ocorre, provavelmente, por causa das políticas públicas implantadas nesses períodos, visando o combate ao mosquito a conscientização e o tratamento precoce da doença.

Por fim, foi elaborado o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que dá continuidade a algumas propostas do PIACD e enfatiza a necessidade de mudanças nos modelos anteriores através da intensificação e implantação de medidas de controle, visando à redução do impacto da dengue no país. Esse último plano teve caráter emergencial a partir de 2002, em função da introdução do novo sorotipo (DENV-3), e que é hoje um programa permanente, executado em todos os municípios brasileiros – mas não têm alcançado os resultados programados e a endemia continuou presente com seus surtos epidêmicos recorrentes (SANTOS, 2009).

2.1.2 - *Agente etiológico*

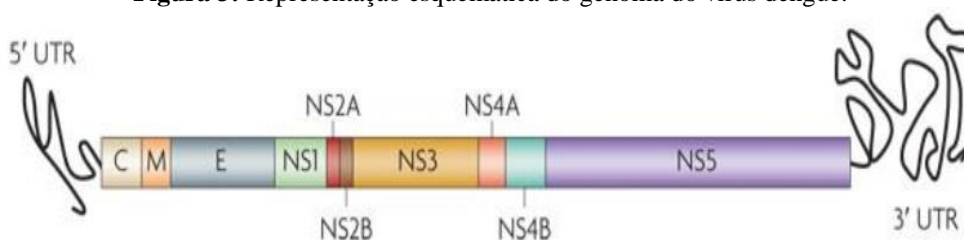
O vírus dengue (DENV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e é transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti*.

Segundo o Ministério da Saúde (2010), a transmissão se faz pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti*, no ciclo ser humano – *Aedes aegypti* – ser humano. Após um repasto de sangue infectado, o mosquito está apto a transmitir o vírus, depois de 8 a 12 dias de incubação extrínseca. A transmissão mecânica também é possível, quando o repasto é interrompido e o mosquito, imediatamente, se alimenta num hospedeiro suscetível próximo. Não há transmissão por contato direto de um doente ou de suas secreções com uma pessoa sadia, nem por intermédio de fontes de água ou alimento.

O vírus da dengue apresenta quatro sorotipos conhecidos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). Esses quatro sorotipos formam um subgrupo no gênero *Flavivirus*. Seu período de incubação é de 3 a 15 dias, com média de 5 a 6 dias (CUNHA *ET AL.*, 2016).

Os *Flavivirus* são vírus RNA envelopados, de cadeia simples, cujo genoma apresentado na Figura 3, codifica três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (NS). As proteínas estruturais são: C (proteína do núcleo), M (proteína da membrana) e E (proteína do envelope). As proteínas não estruturais (NS) são a NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e a NS5 e estão relacionadas com a infecção viral (RIBAS-SILVA E EID, 2012). Entre as proteínas virais, a proteína do envelope é uma das mais antigênicas. Anticorpos para proteína E inibem a ligação do vírus à célula e neutralizam o vírus. Esses anticorpos apresentam graus variáveis de reação cruzada entre os sorotipos dos DENV (SILVA *ET AL.*, 2011).

Figura 3: Representação esquemática do genoma do vírus dengue.



Fonte: (GUZMAN *ET AL.*, 2010).

As proteínas não estruturais são importantes na replicação, na transmissão pelo vetor, na virulência e outras funções no hospedeiro. As proteínas não estruturais NS1, NS3 e NS5 possuem maior peso molecular e são as mais conservadas entre os *Flavivirus* (NESTOROWICZ, CHAMBERS E RICE, 1994).

Um importante alvo dos anticorpos para DENV é a proteína NS1, uma glicoproteína conservada, essencial para a viabilidade do vírus. Essa proteína é expressa na superfície das células infectadas e se encontra na circulação como uma substância solúvel (SILVA *ET AL.*, 2011).

2.1.3 - Proteína NS1

A NS1 é uma glicoproteína não estrutural, que é essencial à replicação viral. Contém cerca de 350 a 354 aminoácidos e 12 resíduos de cisteína, e é altamente conservada. O gene que a codifica gera uma poliproteína que é processada co- e pós-tradução em proteínas

estruturais (Capsídeo, Proteína M e Envelope) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). A NS1 é uma glicoproteína de aproximadamente 48kDa e a estrutura molecular da proteína geralmente é dimérica (SCATURRO *ET AL.*, 2015). Dentre as proteínas não estruturais, é a mais conservada apresentando elevado grau de reação cruzada entre os 4 sorotipos (LIMA, 2009; ZAINAH *ET AL.*, 2009).

Durante a fase aguda da infecção, a NS1 é encontrada circulando no soro de pacientes em concentrações detectáveis por métodos imunológicos, sendo considerada atualmente como um importante marcador de diagnóstico para a infecção aguda pelo vírus da dengue, antes do aparecimento dos anticorpos específicos contra o agente infeccioso, permitindo detecção precoce do vírus, 24 horas após o início dos sintomas, além de ser encontrado nas infecções primárias e secundárias. Portanto, uma nova alternativa diagnóstica surge no mercado com a finalidade de detectar a infecção pelo vírus da dengue antes do aparecimento dos anticorpos da classe IgM/IgG, que é o princípio do diagnóstico da maioria dos testes (PESSOA, 2012).

Contudo, a presença da NS1 na corrente sanguínea aumenta gradativamente atingindo concentração máxima, aproximadamente, no 3º dia de febre, e normalmente desaparece após o 6º dia de infecção. Sendo assim, caso o diagnóstico seja positivo durante esta fase pode-se confirmar a contaminação, mas caso o diagnóstico seja negativo, são necessárias análises confirmatórias, pois a concentração da NS1 pode estar em níveis baixos de serem detectados. A presença dos anticorpos da classe IgG e IgM é crescente ao longo do 4º ou 6º dia, e em caso de uma segunda infecção já haveria presença destes no organismo. Desta forma, torna-se importante a detecção de anticorpos da classe IgG e IgM para que não haja comprometimento do diagnóstico laboratorial.

Segundo Libraty e colaboradores (2002), a função da NS1 na infecção pelo DENV ainda não é totalmente conhecida. Porém, alguns estudos, além de avaliarem a detecção de NS1 como ferramenta para o diagnóstico, também identificaram uma correlação entre a gravidade da doença e a quantidade desse antígeno no soro. Young e colaboradores (2000) desenvolveram um método ELISA de captura capaz de detectar a presença de NS1 em soros de pacientes. O método desenvolvido apresentou sensibilidade de 4 ng/mL, com limite de detecção de 15 ng/mL. Além disso, foi possível fazer uma comparação entre os soros extraídos na fase aguda e convalescente da doença, tanto para infecções primárias quanto secundárias, sendo possível a detecção apenas na fase aguda de infecções primárias. A detecção precoce de altas concentrações de NS1 como ferramenta para prever a evolução clínica da doença tem sido postulada.

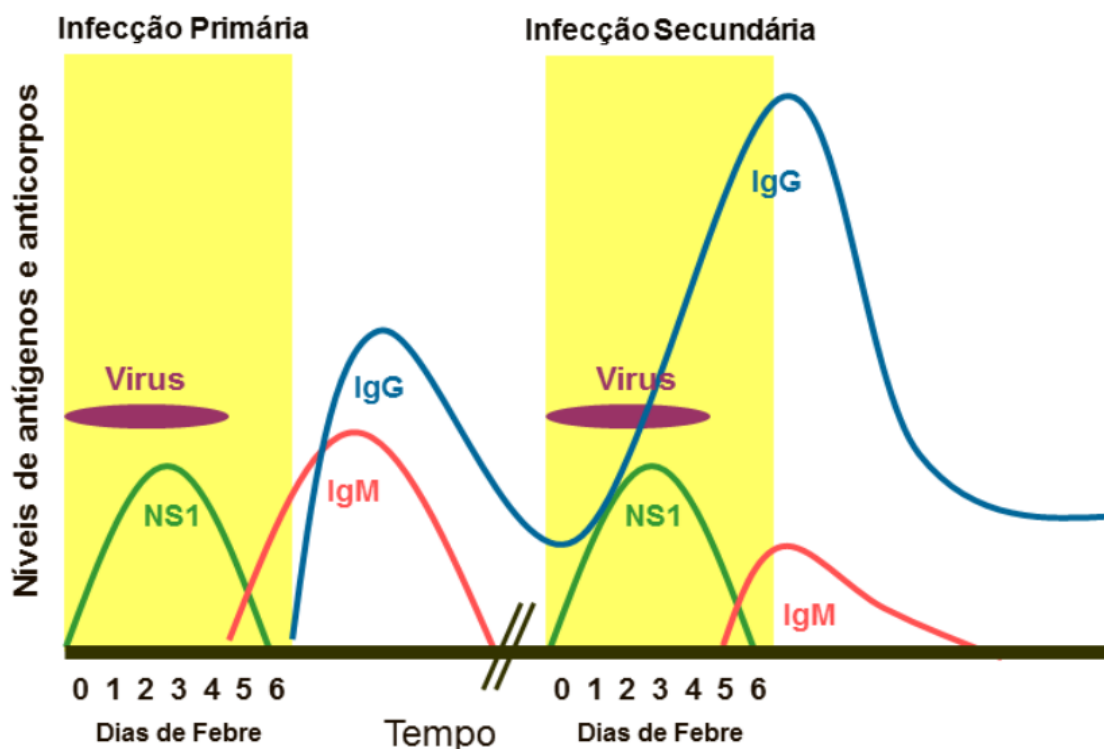
Outros estudos sugerem que a proteína NS1 possa contribuir para a imunopatologia da dengue. Níveis plasmáticos elevados de NS1 em crianças foram associados com a dengue grave, refletindo, possivelmente, no aumento da carga viral nesses pacientes (LIBRATY *ET AL.*, 2002; AVIRUTNAN *ET AL.*, 2006).

2.1.4 - Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da dengue é difícil quando baseado exclusivamente em aspectos clínicos, uma vez que os sintomas podem ser confundidos com outras doenças. Atualmente, uma variedade de métodos detecção está disponível para o diagnóstico de infecção por dengue. O diagnóstico específico se dá através do isolamento viral em cultura de células (YAMADA *ET AL.*, 2002), detecção de RNA através de reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) (NAJIOULLAH, VIRON E CÉSAIRE, 2014), detecção de antígenos virais por imunohistoquímica (AHMED E BROOR, 2014), detecção de anticorpos por testes sorológicos (ELISA) (RIVETZ *ET AL.*, 2009), ou ainda por pesquisa de antígeno NS1 (SULEMAN *ET AL.*, 2016). No entanto, buscam-se alternativas para o diagnóstico visando à minimização de tempo e custos.

De acordo com Halstead (2007), após o início da doença, o vírus pode ser detectado no soro, no plasma e nas células circulantes por quatro a cinco dias, conforme mostrado na Figura 4. Durante esta fase, o isolamento do vírus e a detecção por ácidos nucleicos ou antígenos podem ser usados no diagnóstico da infecção. Após o final da fase aguda, a sorologia é o método de escolha para o diagnóstico. A resposta do anticorpo à infecção ocorre de acordo com a imunidade do paciente. Quando a infecção ocorre em pacientes que não foram infectados antes, o paciente desenvolve uma resposta primária caracterizada por um lento aumento de anticorpos específicos. As imunoglobulinas M (anticorpos IgM) são as primeiras imunoglobulinas a aparecerem. Esses anticorpos são detectáveis em 50% dos pacientes, por três a cinco dias após o início da doença, aumentando para 80% no quinto dia, e 99% no décimo. Os níveis de IgM atingem um pico cerca de duas semanas após o início dos sintomas e, então, declinam, geralmente, a níveis indetectáveis por dois a três meses. Os níveis das imunoglobulinas G (anticorpos IgG) geralmente são detectados em baixas concentrações no final da primeira semana da doença, aumentando lentamente, e permanecem detectáveis após vários meses (ORGANIZATION, 2009; DIAS, 2015).

Figura 4: Representação esquemática dos níveis de anticorpos IgM e IgG e antígeno NS1 durante as respostas primária e secundária aos DENV.



Fonte: SILVA et al., 2011.

Os ensaios sorológicos baseiam-se na pesquisa de anticorpos específicos contra o vírus. Podem ser utilizadas técnicas de neutralização e inibição da hemaglutinação, com amostras pareadas dos pacientes, para observação de conversão sorológica (aumento de quatro vezes ou mais dos títulos de anticorpos), entre a fase aguda da infecção e a fase convalescente. Os métodos sorológicos mais utilizados são os imunoenzimáticos ELISA de captura de anticorpos IgM, que permitem discriminar IgM na fase aguda da doença, facilitando o diagnóstico por necessitar apenas de uma amostra de soro, coletada a partir do sexto dia após início dos sintomas. Como os sintomas iniciais da infecção pelos vírus dengue são inespecíficos, o diagnóstico diferencial é feito para diversos tipos de doenças infecciosas (SILVA ET AL., 2011).

Geralmente, imunoenaios para detecção de anticorpos IgG e IgM contra o vírus dengue são usados para o diagnóstico da infecção em laboratórios de rotina, dentre eles, destacam-se a detecção de anticorpos IgM através do MAC-ELISA e o ELISA-IgG indireto (SHU; HUANG, 2004). Embora o teste de ELISA seja um dos testes mais acessíveis, uma das limitações é a sua vulnerabilidade a reações cruzadas causadas por anticorpos contra outro flavivírus, implicando em uma especificidade não muito alta (YAMADA ET AL., 2002). Por outro

lado, têm-se os testes de isolamento viral e detecção de RNA que são altamente específicos, chegando a obter 100% de resultados positivos sem nenhuma interferência por reatividade cruzada (BARKHAM *ET AL.*, 2006).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2013), o diagnóstico através do isolamento do vírus é um método muito confiável e sensível, porém, requer laboratório especializado para a cultura de células, tem um longo tempo de duração (mais de uma semana, podendo demorar até um mês), não sendo útil para diagnóstico rápido dos pacientes, e tem menor sensibilidade quando comparado com os métodos moleculares (HUNSPERGER *ET AL.*, 2014). A detecção do RNA através da RT-PCR também permite o diagnóstico precoce durante a fase febril. Contudo, a estrutura laboratorial necessária para a realização desse tipo de exame não é corriqueira, há necessidade de equipamentos e reagentes que elevam bastante o custo para sua realização, excluindo a possibilidade deste exame ser encontrado no sistema público de saúde (FIGUEIREDO, 2013). Além do procedimento da técnica ser complicado, o resultado não é imediato, dificultando seu uso rotineiro nos laboratórios de diagnóstico clínico (AHMED E BROOR, 2014; DIAS, 2015).

Segundo Pessoa (2012), diante das limitações dos métodos citados anteriormente, surge a necessidade da realização de um diagnóstico que possibilite uma confirmação precoce da infecção pelo vírus da dengue logo após o início dos sintomas, e que este teste seja de fácil e rápida realização, apresentando alta sensibilidade e especificidade diagnóstica. Para consolidar o diagnóstico precoce da dengue, tem-se, então, a alternativa da pesquisa do antígeno NS1 (DIAS *ET AL.*, 2013), sendo um exame específico para dengue, e um resultado positivo confirma o diagnóstico da doença. Assim, é possível um diagnóstico com maior rapidez, que permitirá uma conduta e tratamento adequados.

Sendo assim, o teste de detecção do antígeno NS1 do vírus da dengue apresenta uma excelente correlação com a replicação viral e permite uma detecção mais precoce do vírus (24 horas após o início dos sintomas), não apresentando reações cruzadas com outros Flavivírus, além de ser encontrado nas infecções primárias e secundárias. Portanto, permite um diagnóstico rápido e diferencial com outras doenças que se manifestam com quadros febris semelhantes, oferecendo oportunidade de início rápido do tratamento e, consequentemente, diminuição da mortalidade por complicações da doença (PESSOA, 2012).

Desta forma, diferentes métodos de detecção do antígeno NS1 foram desenvolvidos recentemente, entre eles estão os kits comerciais disponíveis no mercado, que podem ser empregados no diagnóstico, sempre associados a critério clínico e epidemiológico ou outros métodos laboratoriais (SILVA *ET AL.*, 2011). Estes kits empregam ensaios imunoenzimáticos e

imunocromatográficos para a detecção da proteína viral NS1 (ALCON *ET AL.*, 2002). Como o antígeno NS1 está presente no soro de indivíduos infectados desde o primeiro dia de doença, permanecendo na forma solúvel até o quinto ou sexto dia, seu uso vem sendo estudado como ferramenta de detecção precoce da dengue (SHU *ET AL.*, 2009). Portanto, alguns kits de ELISA são usados para detectar antígenos NS1 no soro do paciente, porém esses kits apresentam baixa sensibilidade, além da necessidade de uso de marcadores. (DIAS, 2015).

Neste contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias simples para o diagnóstico da infecção por vírus da dengue, com o objetivo de diminuir o tempo de execução e os custos do método, sem perder a especificidade e a sensibilidade dos métodos convencionais. Sendo assim, dispositivos como os biossensores podem ser utilizados para este fim, pois eles se apresentam como uma alternativa promissora para as metodologias já existentes, uma vez que apresentam vantagens únicas como alta sensibilidade, seletividade, baixo custo de operação, não é necessária a utilização de mão de obra altamente qualificada, além disso, permitem uma resposta em tempo real e possibilidade de miniaturização do sistema. Neste sentido, os biossensores se mostram como uma ferramenta interessante ao diagnóstico da dengue.

2.2 – Biossensores

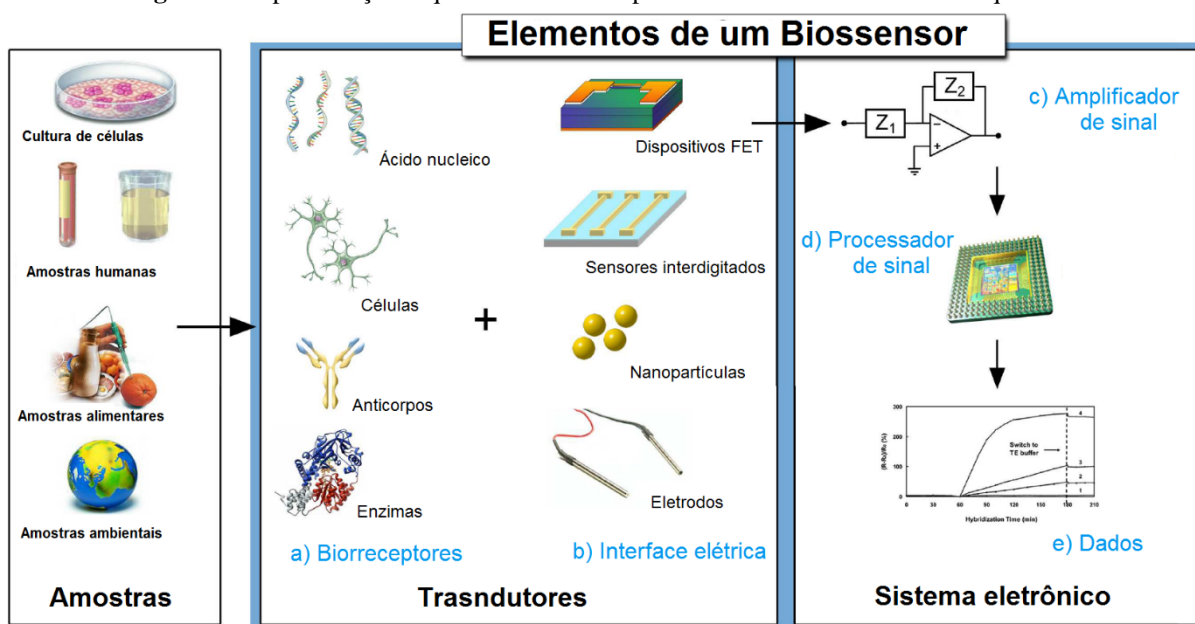
Biossensores têm demonstrado ser um dos mais atrativos métodos analíticos no ramo da detecção genética, imunológica, bioquímica e química. Além disso, destaca-se no monitoramento de parâmetros em diferentes áreas como: diagnósticos clínicos, ciência forense, indústria de alimentos e monitoramento ambiental (ZHU *ET AL.*, 2007; SOUZA, 2014).

Os biossensores apresentam diversas características, tais como facilidade, rapidez, baixo custo e praticidade. Nos últimos anos, eles têm mostrado um grande potencial para aplicações em diversas áreas (HASAN *ET AL.*, 2014), pois a sua utilização traz uma série de vantagens, como a alta sensibilidade e especificidade, pois, as biomoléculas, frequentemente, possuem uma elevada afinidade pelos seus alvos. Além disso, o reconhecimento biológico normalmente é bastante seletivo; como exemplo, tem-se o sistema “chave-fechadura” das reações enzimáticas com seu substrato (NEWMAN E SETFORD, 2006). E por fim, devido ao desenvolvimento da moderna indústria eletrônica, tem sido relativamente fácil desenvolver dispositivos biossensores baratos, integrados e prontos para o uso. Os biossensores melhoram a capacidade de detectar diversas biomoléculas, como antígenos, anticorpos e enzimas (SONG, XU E FAN, 2006).

O primeiro biossensor foi desenvolvido por Clark e Lyons em 1962 (ZHANG, WRIGHT E YANG, 2000) para a determinação da glicose e, desde então, iniciou-se uma grande busca por melhorias de suas propriedades, e diversos outros biossensores foram sendo construídos utilizando-se diferentes enzimas e procedimentos de imobilização (RICCI E PALLESCHI, 2005; SILVA *ET AL.*, 2013).

De acordo com a definição proposta pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), um biossensor é um dispositivo no qual o material de origem biológica, tais como enzima, organela, tecido animal ou vegetal, microrganismo, antígeno ou anticorpo, ácidos nucleicos, entre outros, é imobilizado junto a um transdutor adequado e é capaz de fornecer uma informação analítica específica quantitativa ou qualitativa (HERNÁNDEZ E OSMA, 2014). Sendo assim, ele é constituído por duas partes, o componente biológico e o transdutor. A Figura 5 ilustra o esquema de um biossensor eletroquímico.

Figura 5: Representação esquemática dos componentes de um biossensor eletroquímico.



Fonte: (GRIESHABER *ET AL.*, 2008). Adaptado.

O elemento biosseletivo, conhecido como biorreceptor, é o componente responsável pela seletividade/especificidade dos biossensores, assim, o biorreceptor é o elemento biológico imobilizado (por exemplo, enzima, sonda de DNA, anticorpo) que é reconhecido pelo analito (por exemplo, substrato da enzima, DNA complementar, antígeno). O transdutor é usado para converter o sinal bioquímico resultante da interação do analito com o biorreceptor em um sinal mensurável. A intensidade do sinal gerado é diretamente ou inversamente proporcional à concentração do analito (DIAS, 2015).

De acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como eletroquímico (potenciométrico, amperométrico, condutimétrico e impedimétrico) (YANG, WANG E SHI, 2012), óptico (medida de luminescência, fluorescência, elipsimetria, etc.), detector de massa (relaciona a oscilação da frequência dos cristais piezelétricos com variação da massa). Desta forma, os transdutores eletroquímicos são frequentemente usados no desenvolvimento de biossensores, pois esses sistemas oferecem algumas vantagens, como baixo custo, simples design e pequena dimensão (KOYUN *ET AL.*, 2012).

Conforme o tipo de interação que ocorre entre a substância a ser determinada e o material biológico, o biossensor é classificado como catalítico ou de afinidade (RICCARDI, COSTA E YAMANAKA, 2002).

De acordo com o tipo de biorreceptor, os biossensores podem ser classificados como enzimáticos, imunológicos, microbiológicos, genossensores, etc. Biossensores que podem incorporar diversos tipos de agentes biológicos, como anticorpos, recebem o nome de imunossensor, ou seja, detectam-se especificamente interações do tipo antígeno-anticorpo (Ab-Ag) (HOLFORD, DAVIS E HIGSON, 2012).

2.2.1 - Imunossensores

Imunossensor são um tipo de biossensor baseado na reação imunológica, sendo que o antígeno ou anticorpo é imobilizado na superfície do transdutor (RICCARDI, COSTA E YAMANAKA, 2002). Assim, diversos tipos de imunossensores podem ser construídos, de acordo com o tipo de transdutor empregado (MORGAN, NEWMAN E PRICE, 1996).

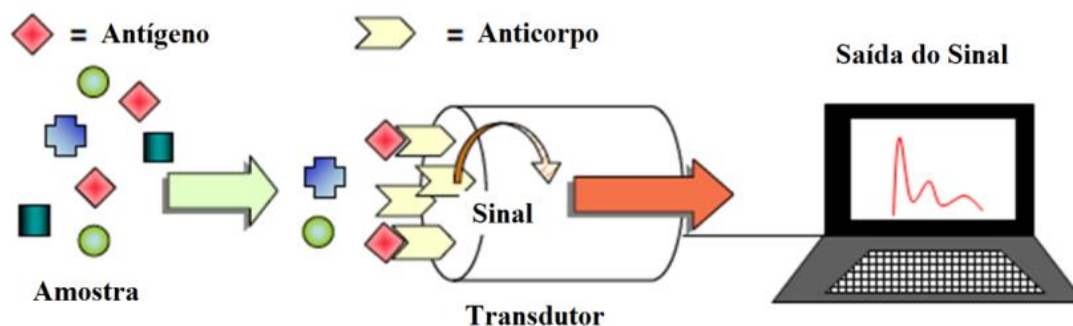
No imunoensaio, o sítio combinatório do anticorpo interage especificamente com porções mais superficiais (determinantes antigênicos) do antígeno, formando um complexo antígeno-anticorpo (VO-DINH E CULLUM, 2000). A característica básica da reação antígeno-anticorpo é a especificidade, representada por uma estreita relação de complementaridade entre as estruturas tridimensionais das duas moléculas (FERREIRA *ET AL.*, 2005).

Os anticorpos são uma família de glicoproteínas conhecidas como imunoglobulinas (Ig). Existem geralmente cinco classes distintas de glicoproteínas (IgA, IgG, IgM, IgD e IgE), sendo a IgG a classe mais abundante (aproximadamente 70%) e mais frequentemente utilizada em técnicas imunoanalíticas (WANG *ET AL.*, 2008).

Atualmente, existem diversos métodos através dos quais é possível monitorar o sinal resultante das interações antígeno-anticorpo e obtê-los na forma de dados que possam ser tratados posteriormente (FIGUEIREDO, 2013). Independente do transdutor, um imunossensor

tem uma estrutura básica, representada na Figura 6. O sinal é gerado através da interação entre o antígeno presente na amostra de interesse e o anticorpo imobilizado, ou vice-versa. Esse sinal é processado pelo transdutor, que pode ser eletroquímico, ótico ou piezelétrico (DU ET AL., 2013), entre outros.

Figura 6: Representação esquemática de um imunossensor.



Fonte: (HOLFORD, DAVIS E HIGSON, 2012).

De acordo com Wang (2012) e colaboradores, as técnicas eletroquímicas estão entre as mais utilizadas devido a sua compatibilidade com tecnologias de miniaturização, com baixo custo, e a possibilidade de detecção sem utilização de marcadores. O sinal eletroquímico obtido possibilita relacionar quantitativamente o analito presente na solução (ZHANG, JU E WANG, 2011).

A literatura descreve alguns imunossensores utilizando diferentes métodos de detecção. Riccardi e colaboradores (2002) desenvolveram imunossensores que empregam transdutor amperométrico. Desta forma, alguns imunossensores amperométricos têm sido empregados em pesquisas para a determinação de vários anticorpos, antígenos ou haptenos (substância não proteica, de baixo peso molecular). Em algumas determinações, a substância a ser analisada é a própria enzima, por exemplo, a isoenzima lactato desidrogenase (LDH-1) cuja concentração no soro pode ser indicativa de infarto agudo do miocárdio. Nesse caso, o anticorpo *anti*-LDH-1 encontra-se imobilizado em membrana pré-ativada e a isoenzima foi determinada pela reação eletroquímica envolvendo o NADH (KELLY, COMPAGNONE E GUILBAULT, 1998). Já Camara e colaboradores (2013) descreveram um imunossensor para dengue, se trata de um sensor de fibra óptica baseado na ressonância de plásmon de superfície utilizando nanopartículas de ouro imobilizadas na extremidade da fibra. O sensor foi capaz de detectar antígenos NS1 em diferentes concentrações, com um limite de quantificação de 0,074 µg/mL. Neste caso, o nível de NS1 detectado está dentro da faixa encontrada nos soros dos pacientes com dengue. Mesmo assim, ainda se faz necessário o uso de novas tecnologias no

desenvolvimento de dispositivos sensores portáteis, de menor custo e rápida resposta para uso no diagnóstico precoce da dengue na fase aguda (DIAS, 2015).

Neste contexto, pesquisas recentes demonstram que a aplicação de sensores baseados em polímeros tem sido bastante utilizada na área de diagnóstico clínico, tornando-se produtos comerciais portáteis e cada vez mais miniaturizados. Biossensores eletroquímicos, óticos, mecânicos e físicos vêm sendo desenvolvidos a partir de novas tecnologias baseados em nanotubos de carbono, partículas magnéticas, nanopartículas de ouro e polímeros. Destacam-se também na utilização em análises de DNA, marcadores cardíacos, doenças autoimunes, infecções virais e bacterianas (IOST E CRESPILO, 2012).

2.3 – Filmes Poliméricos

Os polímeros condutores estão sendo cada vez mais utilizados para diversas aplicações. O desenvolvimento de eletrodos modificados com filmes poliméricos tem atraído muita atenção pela flexibilidade de suas propriedades químicas e físicas, o que os torna interessantes para utilização em áreas de importantes avanços tecnológicos.

Os polímeros condutores são materiais modernos com várias aplicações, cujas sínteses e propriedades têm sido estudadas extensivamente devido ao interesse crescente no mecanismo de sua polimerização e transformação redox entre estados condutores e não condutores. Portanto, um critério importante na seleção de um polímero para ser utilizado na construção de um biossensor é a facilidade com que ele pode ser oxidado ou reduzido (INZELT, 2012).

A utilização de polímeros condutores teve uma crescente utilização na área médica após os anos 80, pois foi descoberta a sua compatibilidade com diversas moléculas biológicas (GUIMARD, GOMEZ E SCHMIDT, 2007). Sua utilização tem se mostrado eficaz na produção de biossensores, por apresentarem baixo custo, ser uma técnica simples, e poder ser depositado sobre variados tipos de substratos, proporcionando a construção de diversificados tipos de filmes com particularidades diferentes (HARSÁNYI, 2000; BRITO-MADURRO *ET AL.*, 2007; FERREIRA *ET AL.*, 2008; SILVA *ET AL.*, 2009; FERREIRA *ET AL.*, 2011; RODRIGUES *ET AL.*, 2014; FERREIRA *ET AL.*, 2015; RODRIGUES *ET AL.*, 2015; ALVES *ET AL.*, 2017).

Para fornecer uma matriz de imobilização adequada, as superfícies dos eletrodos podem ser funcionalizadas com diferentes modificadores. A funcionalização é caracterizada pela modificação química da superfície, proporcionando condições ótimas para o processo de imobilização (SRIVASTAVA *ET AL.*, 2014).

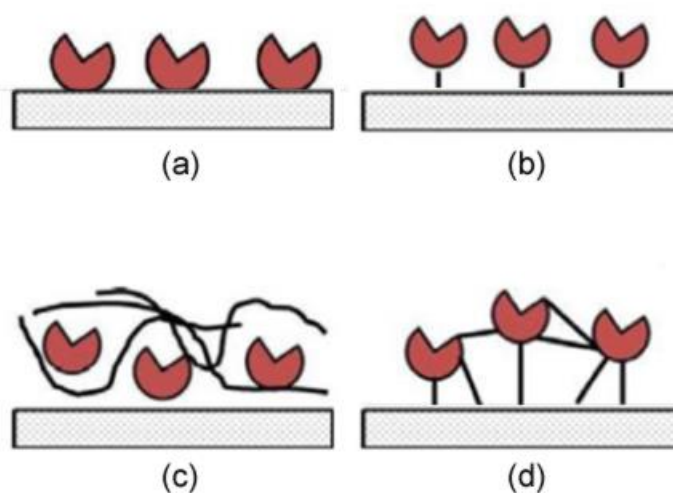
Sendo assim, a modificação de superfície por filmes finos poliméricos condutores é uma metodologia amplamente utilizada para adaptar as propriedades de superfície como a biocompatibilidade. Contudo, uma etapa muito importante na construção de um biossensor é a imobilização da biomolécula, que deve estar ligada de maneira adequada ao transdutor e facilitar a transferência de elétrons. Desse modo, é possível se ter um biossensor viável, com uma boa sensibilidade e estabilidade operacional (BARIOTO, 2009).

O método de imobilização é caracterizado pela ligação entre o componente biológico e o sensor, mantendo as características biológicas originais do componente (SETHI, 1994). Este procedimento é realizado através de algumas técnicas de imobilização encontradas na literatura.

2.4 – Técnicas de imobilização

Os métodos de imobilização de biomoléculas são um fator fundamental nas etapas de desenvolvimento dos biossensores. Essa escolha traz consequências diretas na reprodutibilidade e sensibilidade do sistema (BARIOTO, 2009). As principais estratégias de imobilização são: adsorção física, ligação covalente, ligação cruzada ou encapsulamento (AHUJA, MIR E KUMAR, 2007). A Figura 7 mostra um esquema das técnicas de imobilização.

Figura 7: Principais estratégias de imobilização: (a) adsorção física, (b) ligação covalente, (c) ligação cruzada e (d) encapsulamento.



Fonte: (OLIVEIRA ET AL., 2013). Adaptado.

A técnica por adsorção física consiste em reter a biomolécula nas proximidades da superfície do transdutor por meio de forças de ligações devido às pontes de hidrogênio, Van der Waals e pela formação de sítios complexos de transferências de elétrons (BARIOTO, 2009). As vantagens desta técnica são: simplicidade, ausência de modificação da biomolécula, baixo custo e possibilidade de regeneração da matriz. A desvantagem da técnica é que sofre dessorção ao longo do tempo, causando uma baixa estabilidade na técnica (LEI, CHEN E MULCHANDANI, 2006).

O método por ligação covalente baseia-se na formação de uma ligação covalente estável entre grupos funcionais do biocomponente (amina, carboxila ou sulfidril, por exemplo) com grupos funcionais presentes nos transdutores (amina, carboxila ou tosila, por exemplo) (LEI, CHEN E MULCHANDANI, 2006). Essa técnica permite a utilização de filmes poliméricos como matriz de suporte, os quais podem ser eletropolimerizados, antes da imobilização, sob condições (solvente orgânico, altos valores de potenciais para o processo de polimerização) que causariam danos à estrutura da biomolécula. A vantagem deste método é a sua estabilidade e a desvantagem é que a matriz de suporte não é regenerável, o que causaria perda da atividade devido a reações envolvendo grupos essenciais da atividade biológica (VIEIRA, 2011).

Na imobilização por ligação cruzada utiliza-se um reagente bifuncional, tal como o glutaraldeído, ou multifuncional, tal como o hexametileno di-isocianato, para a imobilização da molécula em vários tipos de suportes sólidos (SOUZA, KUBOTA E YAMAMOTO, 1999). Ao usar esta técnica, é necessário que se preocupe com a acessibilidade do componente bioativo, e a vantagem dela é a simplicidade, a perda mínima da atividade do componente biológico e custo moderado. A desvantagem é que pode demorar mais para se obter respostas ao biossensor, devido à formação de barreiras de difusão (NUNES, JEANTY E MARTY, 2004).

No método de encapsulamento, o elemento biológico se encontra envolto por uma membrana que limita sua contaminação e deterioração. O encapsulamento pode proteger o componente biológico de mudanças na temperatura, pH, força iônica e composição química. Além disso, a membrana pode ser permeável a algumas substâncias (moléculas pequenas, gases e elétrons) que se deseja detectar (BUČKO *ET AL.*, 2012). Um exemplo de imobilização por encapsulamento é a preparação de filmes poliméricos em soluções contendo biomoléculas, essas por sua vez ficam presas durante todo o processo. O processo de interação entre as moléculas pode ser físico ou químico, através de ligações covalentes (LEI, CHEN E MULCHANDANI, 2006). A vantagem é que o filme pode ser preparado rapidamente, de forma simples, é uma técnica bem versátil, além de poder eletrogerar um polímero cobrindo a superfície de um eletrodo com geometria complexa, com baixo custo. As desvantagens são: formação de radicais

livres, alta barreira de difusão, o que causa a perda do desempenho da biomolécula (VIEIRA, 2011).

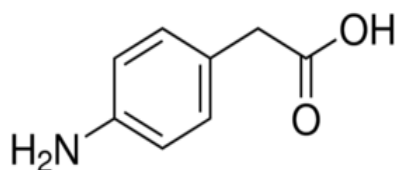
Conforme descrito na literatura, os polímeros condutores funcionalizados permitem a modificação da superfície de eletrodos para diversas aplicações, dentre elas, a incorporação de biomoléculas. Além disso, aumentam a velocidade, sensibilidade e versatilidade dos biossensores em várias aplicações, como o diagnóstico de doenças. Portanto, estes filmes poliméricos derivados de monômeros funcionalizados, têm sido muito utilizados na confecção de diversos tipos de biossensores.

2.5 – Ácido 4-aminofenilacético

Os monômeros utilizados para a eletrossíntese de polímeros condutores são geralmente compostos aromáticos. Isto é devido à facilidade com que esses compostos podem ser oxidados a cátions-radicais relativamente estáveis durante o processo de eletropolimerização (SADKI *ET AL.*, 2000).

O monômero ácido 4-aminofenilacético (4-AFA), também conhecido como ácido *p*-aminofenilacético, é um composto com fórmula molecular $C_8H_9NO_2$. O 4-AFA é um material eletroquimicamente ativo, pois a sua molécula possui grupos carboxila e amino. Sua estrutura química está representada na Figura 8.

Figura 8: Estrutura química do ácido 4-aminofenilacético.



A utilização de monômeros funcionalizados é baseada em vários estudos que demonstram que os grupos funcionais podem ser preservados durante o processo de eletropolimerização, e desta forma podem interagir com os grupos funcionais do componente biológico, permitindo-se maior eficiência no procedimento de imobilização, resultando assim no aumento da seletividade e sensibilidade do sistema, através do monitoramento do analito de interesse (BRITO-MADURRO *ET AL.*, 2007; FERREIRA *ET AL.*, 2008; SILVA *ET AL.*, 2009; FERREIRA *ET AL.*, 2011; RODRIGUES *ET AL.*, 2014; FERREIRA *ET AL.*, 2015; RODRIGUES *ET AL.*, 2015; ALVES *ET AL.*, 2017).

O 4-AFA é um monômero pouquíssimo reportado na literatura, apesar disso, é um monômero que pode ser utilizado em diferentes aplicações. Zhang e colaboradores (2009) realizaram uma síntese, mediada pelo 4-AFA, de microesferas híbridas de óxido de titânio monodispersas em solução de etanol. As microesferas híbridas de TiO_2 monodispersas foram preparadas através da hidrólise de isopropóxido de titânio (TTIP) em solução de etanol contendo 4-AFA. Os efeitos da relação molar 4-AFA:TTIP, teor de água, tempo de reação e temperatura de reação na morfologia das esferas resultantes foram investigados. Posteriormente, os produtos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, análise termogravimétrica e difração de raios X (ZHANG *ET AL.*, 2009).

De acordo com a literatura, nos últimos anos vem sendo realizados alguns trabalhos com o objetivo de diagnóstico do vírus da dengue, principalmente através de métodos impedimétricos (KUMBHAT *ET AL.*, 2010; NGUYEN *ET AL.*, 2012; PEH E LI, 2013), já que o evento de imunocomplexação antígeno/anticorpo não gera sinal elétrico mensurável. Nesse caso, cria-se apenas uma barreira na superfície transdutora, facilitando ou dificultando a transferência eletrônica que ocorre na dupla camada elétrica.

Neste contexto, visando contribuir para o desenvolvimento de plataformas integradas ao diagnóstico rápido da dengue, o presente trabalho propõe a utilização da modificação de eletrodos impressos de grafite (EI) com filmes poliméricos derivados do monômero 4-AFA, para fins de imobilização do antígeno NS1, visando o desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico para o diagnóstico da dengue.

Dentre os principais destaques do trabalho, podemos citar: i) o estudo, investigação e caracterização de uma nova plataforma eletroquímica modificada com filmes poliméricos derivados do 4-AFA para imobilização de biomoléculas; ii) a utilização de eletrodos impressos que permite a possibilidade de realização de testes rápidos, descentralizados e com volume reduzido de amostras; iii) a imobilização da NS1 como estratégia de reconhecimento e diagnóstico da Dengue e iv) a utilização de amostras de soros humanos para realização dos estudos de desenvolvimento e otimização do biossensor.

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Desenvolver um imunossensor impedimétrico para diagnóstico de Dengue, utilizando como transdutor eletrodos impressos de grafite modificados com filmes poliméricos derivado do ácido 4-aminofenilacético. A NS1 será a biomolécula imobilizada, e os estudos fundamentam-se na estratégia de reconhecimento da interação desta proteína para detecção e quantificação de anticorpos de classe IgG e IgM, presentes em amostras de soro humano, contra o antígeno da dengue.

3.2 – Objetivos específicos

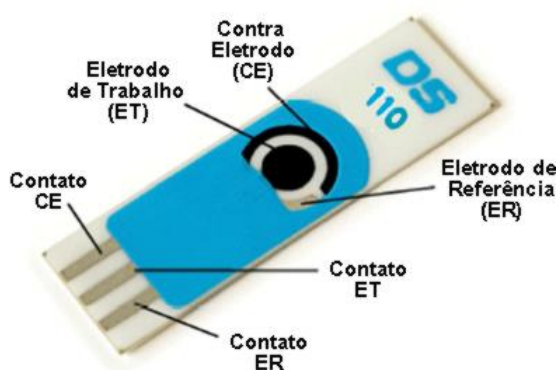
- ✓ Eletropolimerizar o 4-AFA sobre EI;
- ✓ Analisar as propriedades de transferência de carga do poli(4-AFA);
- ✓ Caracterizar o filme polimérico formado na superfície do eletrodo de trabalho pelas técnicas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e Voltametria Cíclica (VC);
- ✓ Verificar a eficiência da plataforma desenvolvida na imobilização do antígeno NS1;
- ✓ Otimizar a concentração de NS1 imobilizada;
- ✓ Analisar a resposta do imunossensor ao reconhecimento de anticorpos positivos presentes em amostras de soros humanos diagnosticados com Dengue;
- ✓ Monitorar a interação anticorpo/antígeno através da técnica de EIE sobre a plataforma proposta;
- ✓ Verificar o tempo de imunorreação para o biossensor desenvolvido;
- ✓ Investigar o efeito da diluição dos soros positivos na sensibilidade do imunossensor;
- ✓ Avaliar a resposta do biossensor para interações não específicas utilizando amostras de soro de pacientes saudáveis;
- ✓ Investigar a influência da diluição das amostras de soros negativos na resposta do imunossensor;
- ✓ Demonstrar a importância da modificação do EI com o poli(4-AFA) para o desenvolvimento do imunossensor;
- ✓ Avaliar a aplicabilidade do dispositivo propostos frente a realização de testes descentralizados para a Dengue.

4. METODOLOGIA

4.1 – Instrumentação e soluções

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando Potenciostato/Galvanostato da Autolab®, modelo PGSTAT 128N, utilizando-se eletrodo impresso de grafite (EI) da DropSens® conforme mostrado na Figura 9. A aquisição dos dados foi feita pelo *software* NOVA versão 1.10.

Figura 9: Eletrodo impresso de grafite obtido da DroSens®. Dimensões: 3,4 x 1,0 x 0,05 cm comprimento x largura x altura).



Fonte: DropSens®. Adaptado.

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico e as soluções aquosas foram preparadas utilizando-se água deionizada obtida por ultrapurificador de água Master System MS 2000 (GEHAKA).

Todas as soluções utilizadas no procedimento de eletropolimerização, bem como as de análise de caracterização e detecção, foram preparadas antes do uso de cada procedimento, e desoxigenadas por meio de fluxo gasoso de N₂ por cerca de 10 minutos.

As soluções utilizadas nas seguintes composições e concentrações foram: solução 0,50 M de Ácido Sulfúrico (Vetec, 98%); solução 5,00 mM de Ferro/Ferricianeto de Potássio (Sigma-Aldrich, 99%) contendo 0,10 M de KCl (Vetec, 99%); solução 2,50 mM de 4-HFA (Sigma-Aldrich, 99%); solução tampão HBS-EP pH 7,4 (misturou-se soluções de 10,0 mM Hepes pH 7,4, 3,0 mM EDTA pH 8,0, 150,0 mM NaCl e 0.005% polissorbato 20).

As amostras de soros positivos e negativos, não diluídas e, da proteína NS1 recombinante (rNS1) foram cedidas pelo Professor Dr. Ronaldo Luís Thomasini, docente do

Curso de Medicina da UFVJM. As amostras fazem parte de um painel sorológico com resultados conhecidos para anti-NS1.

A rNS1 foi sintetizada por indução pelo Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) em *Escherichia coli* BL21 roseta, transformada com plasmídio Pet-28a(+) contendo sequência da NS1 (Dengue 2, Myanmar cepa MM-2, *Genbank Accession Number*: U51929) e purificada por Cromatografia de Afinidade em Coluna com Níquel Imobilizado-IMAC (proteína contendo calda de poli-histidina) (*artigo em fase de publicação*).

4.2. Procedimento Experimental

4.2.1 – Eletropolimerização do 4-AFA

Antes de iniciar a etapa de eletropolimerização, foi realizada uma análise/condicionamento dos eletrodos de trabalhos por meio da técnica de voltametria cíclica (VC) adicionando-se 60 μ L de solução de ácido sulfúrico 0,50 M à superfície do eletrodo. Utilizou-se também 60 μ L de solução aquosa de ferrocianeto/ferricianeto de potássio 5,0 mM contendo KCl 0,10 M. Nessas etapas, realizaram-se três ciclos consecutivos na presença de ácido sulfúrico 0,50 M, na faixa de potencial de $-0,20$ a $+0,90$ V, e 1 ciclo de potencial na presença de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$, numa faixa de potencial de $-0,55$ a $+0,80$ V.

A eletropolimerização do monômero 4-AFA foi realizada utilizando-se EI, por meio da técnica de VC. Os voltamogramas cíclicos foram registrados numa faixa de potencial de $-0,20$ a $+0,90$ V, 10 ciclos, em solução aquosa 2,50 mM de 4-AFA contendo solução 0,50 M de ácido sulfúrico.

4.2.2 – Propriedades eletroquímicas do poli(4-AFA)

As propriedades eletroquímicas de troca iônica para o EI e para o EI modificado com poli(4-AFA) – EI/poli(4-HFA) – foram investigadas por VC utilizando a sonda redox ferro/ferricianeto de potássio em concentração 5,00 mM contendo 0,10 M de KCl, varrendo numa faixa de potencial $-0,55$ a $+0,80$ V. Realizou-se também voltamogramas cíclicos somente na solução do eletrólito suporte (KCl 0,10 M), na mesma região de potencial do par redox, a fim de verificar a contribuição eletroativa do filme formado no processo do par redox.

4.2.3 – Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica dos EI, EI/poli(4-AFA), e posteriormente imobilizados com a proteína NS1 e interação do imunossensor com os soros positivos e negativos foram obtidas em solução aquosa 5,00 mM de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ contendo KCl 0,10 M. A solução de análise foi desoxigenada com nitrogênio gasoso ultrapuro por cerca de 10 minutos. O intervalo de frequência investigado foi de 10^5 a 10^{-2} Hz. A amplitude de excitação senoidal foi de 10 mV, tendo o potencial de circuito aberto (OCP) aplicado.

4.2.4 – Imobilização antígeno NS1 e detecção dos anticorpos anti-NS1

Soluções de NS1 com concentrações de 6, 3, 1 e 0,1 mg/mL, 10, 1 e 0,1 µg/mL e 1 ng/mL foram preparadas em solução tampão HBS-EP pH 7,40. Em seguida, oito EI previamente modificados com poli(4-AFA) foram separados para imobilização da NS1 nas diferentes concentrações, adicionando-se 30 µL dessas soluções à superfície do eletrodo de trabalho. Então, os EI foram levados à estufa a 37 °C durante 20 minutos. Após esse período, os EI foram lavados com solução tampão HBS-EP pH 7,40 e, em seguida, seco sob fluxo de nitrogênio gasoso para registro do espectro de EIE.

Para imobilização dos soros positivos e negativos, foram feitas diluições em solução tampão HBS-EP pH 7,40 nas seguintes proporções: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280. De cada solução, pipetou-se 30 µL e adicionou-se à superfície de diferentes eletrodos previamente modificados com a proteína NS1 (EI/poli(4-AFA)/NS1). Levou-se os eletrodos à estufa a 37 °C por 20 minutos. Após esse período, os eletrodos foram lavados, separadamente, com solução de tampão HBS-EP pH 7,40 e, em seguida, secos sob fluxo de nitrogênio gasoso para registro do espectro de EIE.

Medidas de espectroscopia de impedância foram realizadas na presença de solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Essa solução foi previamente desoxigenada, por 10 minutos, sob fluxo de nitrogênio gasoso.

As soluções de NS1 e as diluições dos soros positivo e negativo foram preparadas em solução tampão HBS-EP pH 7,40.

4.2.5 – Estudo do tempo de imunorreação

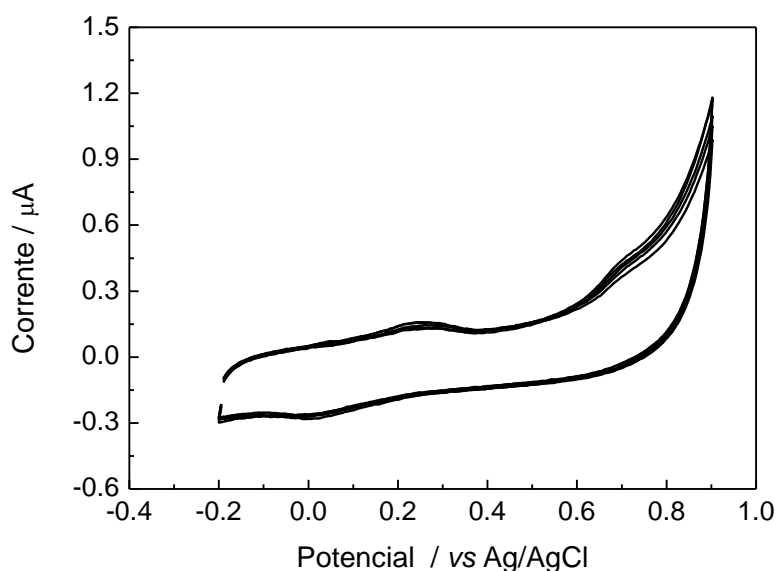
Para o estudo do tempo de reação Ag/Ac, adicionou-se 30 µL do soro positivo (diluição 1:100) ao EI/poli(4-AFA)/NS1 ([NS1] = 1 ng/mL) e levou para a estufa a 37 °C, variando-se o tempo em 5, 10, 20, 40 e 80 minutos. Em seguida, os eletrodos foram lavados com solução tampão HBS-EP pH 7,40 e secos sob fluxo de nitrogênio gasoso.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Eletropolimerização do 4-AFA por VC

Antes da etapa de eletropolimerização, todos os EI foram condicionados em solução de ácido sulfúrico 0,50 M, a fim de verificar a presença de atividade redox na faixa utilizada para a eletropolimerização e, dessa forma, garantir uma limpeza dos EI. Para isso, os eletrodos foram avaliados, por VC, em presença de solução do ácido sulfúrico 0,50 M, na faixa de potencial de $-0,20$ a $+0,90$ V conforme apresentado na Figura 10.

Figura 10: VCs consecutivos do EI em solução 0,50 M de ácido sulfúrico. Número de ciclos = 5; $\nu = 50$ mV/s.



Pela Figura 10, pode-se perceber uma baixa eletroatividade do EI quando submetido a consecutivos ciclos de potencial, na faixa de $-0,20$ a $+0,90$ V a qual será utilizada na eletropolimerização do 4-AFA.

Estudos preliminares, utilizando VC, foram realizados a fim de verificar a atividade eletroquímica do monômero 4-AFA. Tal estudo foi feito na faixa de $-0,20$ a $+0,90$ V, em velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} e 10 ciclos de potencial. Ácido sulfúrico 0,50 M foi utilizado como eletrólito suporte e a concentração do monômero foi mantida em 2,50 mM.

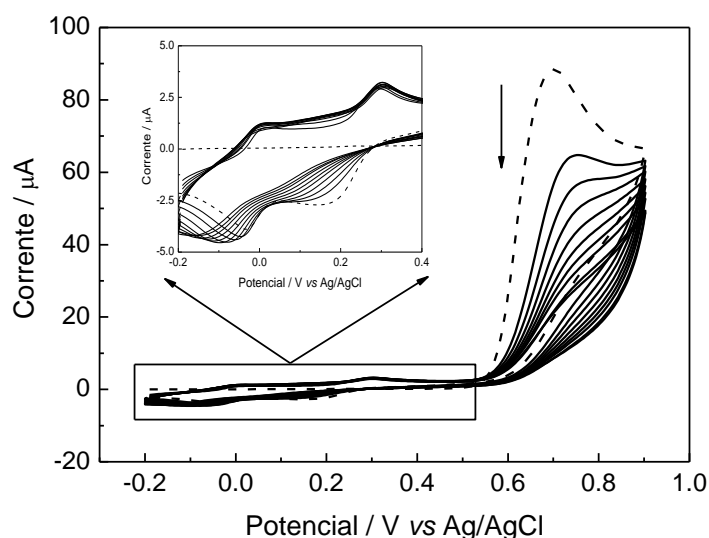
Na maioria dos casos, o processo de eletropolimerização envolve a oxidação de monômeros num potencial específico para formar um cátion radical numa solução eletrolítica. Posteriormente, o cátion radical é acoplado com outros monômeros presentes na solução para

formar, primeiro, produtos oligoméricos e, depois, o polímero. A conjugação prolongada no polímero resulta numa diminuição do potencial de oxidação em comparação com o monômero. No final da reação, é formado um filme polimérico de espessura controlável (FOURATI et al., 2016).

A Figura 11 mostra o voltamograma cíclico referente à eletropolimerização do 4-AFA, no qual, no primeiro ciclo de potencial, pode-se observar um pico de oxidação, referente à oxidação do 4-AFA, em +0,70 V, o que indica a formação de cátion-radicais, necessários para iniciar o processo de polimerização. Observa-se também dois picos de redução, um em +0,18 V e o outro em -0,034 V, referente à redução do filme polimérico que começa a se formar na superfície do eletrodo.

Após o segundo ciclo de potencial é possível perceber duas ondas de oxidação que surgem nos potenciais de +0,010 e + 0,30 V (*inset* da Figura 11) referente à oxidação do filme formado no eletrodo.

Figura 11: VCs consecutivos do 4-AFA (10 ciclos) em solução 0,50 M de H_2SO_4 , na faixa de potencial de -0,20 a +0,90 V. $\nu = 50 \text{ mV/s}$. [4-AFA] = 2,50 mM. (---) 1º ciclo de potencial.

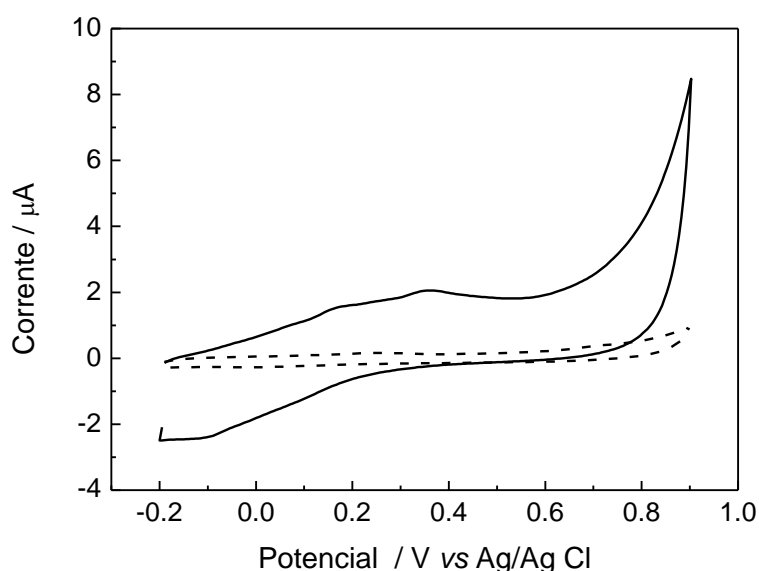


Após sucessivos ciclos, pode-se perceber uma diminuição da corrente de pico anódica em +0,70 V, além de um pequeno deslocamento do potencial de oxidação para regiões mais positivas, podendo esses acontecimentos, estar relacionado ao consumo do monômero na superfície do eletrodo para conseqüente formação do filme polimérico poli(4-AFA), o que leva a um bloqueio parcial da superfície do eletrodo.

5.2 – Comportamento eletroquímico do poli(4-AFA)

Posteriormente a etapa de eletropolimerização, os EI/poli(4-AFA) formam lavados com água deionizada em abundância, e secos sob fluxo de N_2 gasoso. Em seguida, foram submetidos a cinco ciclos de potencial em meio de solução contendo somente o eletrólito suporte, na mesma faixa de potencial utilizada na eletropolimerização, a fim de verificar a adsorção do filme polimérico, bem como analisar sua atividade eletroquímica. Esta etapa também é importante, pois permite remover possíveis monômeros que possam ter adsorvidos à estrutura do filme polimérico. Sendo assim, a Figura 12 apresenta os voltamogramas cíclicos referente a esse estudo.

Figura 12: VC obtidos em solução de H_2SO_4 0,50 M. $v = 100$ mV/s para: (---) EI e (—) EI/poli(4-AFA).



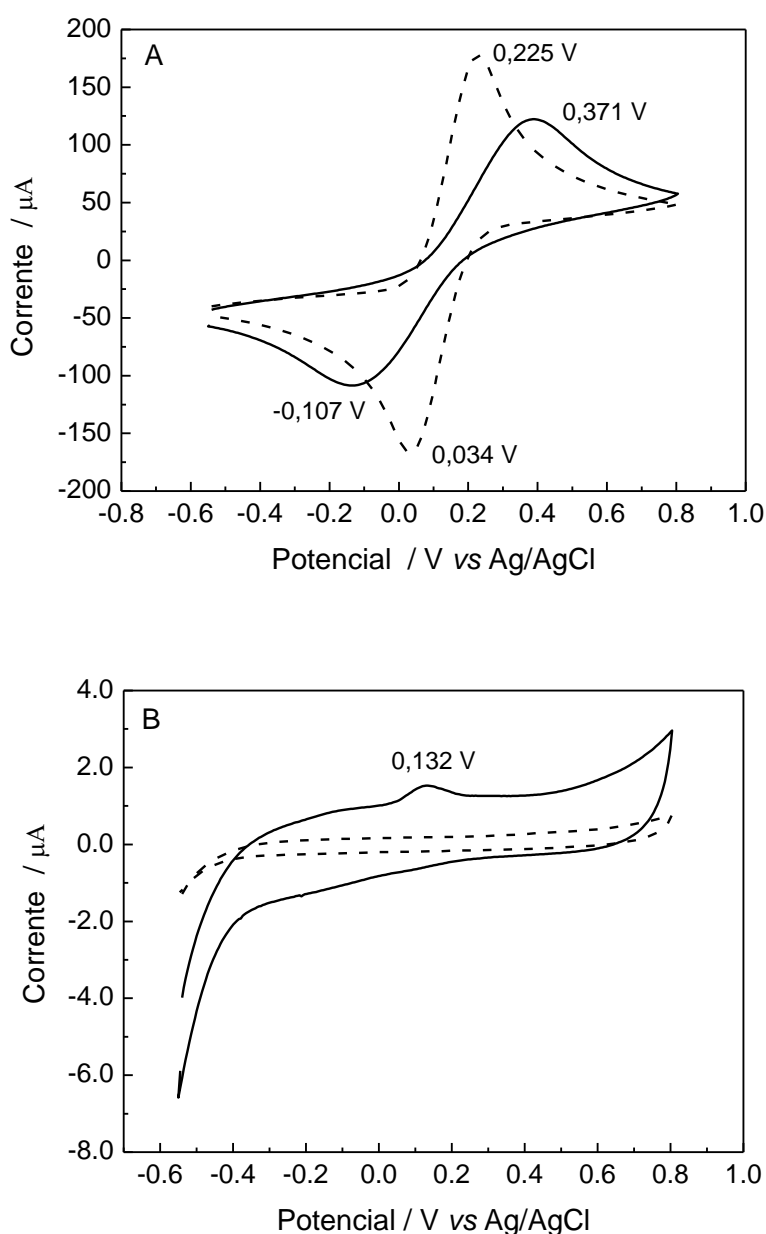
Pode-se perceber que houve uma alteração da resposta eletroquímica do EI/poli(4-AFA) quando comparada com o EI, sendo possível observar uma eletroatividade em +0,17 e +0,35 V. Esse resultado confirma a formação de um material eletroativo depositado na superfície do eletrodo.

5.3 – Propriedades de transferência de carga do poli(4-AFA)

Tendo em visto que o EI foi modificado com filme polimérico derivado do 4-AFA, espera-se que o comportamento eletroquímico do EI/poli(4-AFA) seja alterado. Tal alteração

pode ser investigada frente à sonda redox ferro/ferricianeto de potássio, que apresenta um comportamento eletroquímico bem conhecido. Sendo assim, a Figura 13A e 13B apresenta os VCs dos EI e EI/poli(4-AFA) obtidos em solução 5,00 mM de ferro/ferricianeto de potássio contendo KCl 0,10 M para fins de verificação da eletroatividade do material adsorvido na superfície do eletrodo frente a sonda redox, bem como análise do seu comportamento somente em solução do eletrólito suporte.

Figura 13: VCs referente ao (---) EI e (—) EI/poli(4AFA) em: (A) solução 5,00 mM de ferro/ferricianeto de potássio contendo KCl 0,10 M e (B) solução de KCl 0,10 M. $\nu = 100$ mV/s.



Pode-se perceber, pelo gráfico da Figura 13A, que o VC para o EI apresentou um $\Delta E = 191$ mV e uma relação de $I_{pa}/I_{pc} = 1,04$. Já o EI/poli(4-AFA) apresentou $\Delta E = 478$ mV e relação de $I_{pa}/I_{pc} = 1,14$. Além disto, as I_{pa} e I_{pc} diminuíram e os potenciais E_a e E_c para o EI/poli(4-AFA) deslocaram-se, quando comparados com o EI. Isso mostra a modificação da superfície do EI, e que o filme polimérico formado dificulta o processo de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução.

Com o objetivo de verificar que o filme poli(4-AFA) contribui para o efeito observado na Figura 13A, analisou-se o VC em meio somente de KCl 0,10 M na mesma faixa de potencial do par redox (Figura 13B). Observa-se que o VC referente ao EI/poli(4-AFA) apresentou um pequeno pico de oxidação em +0,132V e que para o EI nenhuma atividade eletroquímica é observada. Desta forma, pode-se dizer que tal efeito observado na Figura 13A não tem grandes contribuições da eletroatividade do filme polimérico.

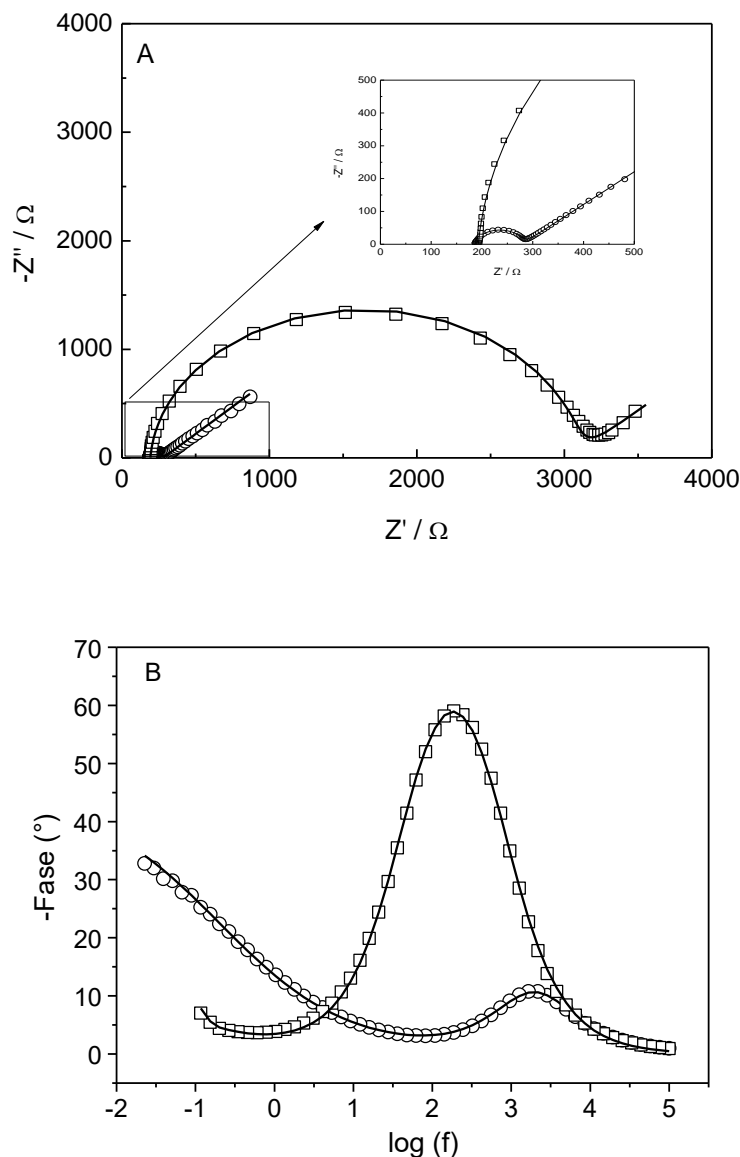
5.4 – Análises de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A técnica de impedância tem sido amplamente utilizada na área de biossensores, especialmente imunossensores, por fornecer informações detalhadas sobre as características de sistemas eletroquímicos. Para sistemas eletroquímicos que utilizam eletrodos modificados, a EIE fornece informações importantes dos processos eletroquímicos interfaciais, como resistência da solução, resistência à transferência de carga e capacitância da dupla camada elétrica.

Eletrodos constituídos por um material condutor, tal como o grafite, quando imerso numa solução iônica, adquirem uma camada elétrica dupla que, sob condições específicas, podem exibir propriedades capacitivas e condutoras. Após a obtenção de condições de estado estacionário, a capacitância da dupla camada elétrica e a resistência à transferência de carga, por meio do circuito equivalente, podem ser interpretadas como um capacitor e um resistor, respectivamente (RAMANAVICIUS, GENYS E RAMANAVICIENE, 2014).

Nesse sentido, o EI/poli(4-AFA) foi avaliado por EIE e os dados obtidos foram comparados com o EI não modificado. A Figura 14 apresenta os diagramas de Nyquist e Bode para ambos os eletrodos estudados. A Figura 14 A mostra os Diagramas de Nyquist obtidos nesse estudo. A análise desses gráficos evidencia duas regiões bem distintas: uma região em altas frequências, na qual aparece um semicírculo, que está relacionado à resistência à transferência de carga, e outra região, nas baixas frequências, na qual aparece uma reta, que está relacionada a processos de transferência de massa por difusão.

Figura 14: Diagramas de Nyquist (A) e Bode (B) dos espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para: (○) EI e (□) EI/poli(4-AFA). As linhas sólidas representam a simulação dos dados experimentais para um circuito equivalente. Amplitude 10 mV. Intervalo de frequência: 10^5 a 10^{-2} Hz. $E_{app} = OCP$.



Na Figura 14B o diagrama de Bode representa o ângulo de fase em função do logaritmo da frequência, onde é possível observar que em altas frequências o ângulo de fase tende a 0, comportamento característico de um resistor, onde neste caso temos a resistência ôhmica da solução. Em frequências intermediárias observa-se um comportamento capacitivo, e em baixas frequências os valores do ângulo de fase retornam a 0, tendo-se novamente um comportamento resistivo, a qual considera agora a resistência ôhmica e a de transferência de carga.

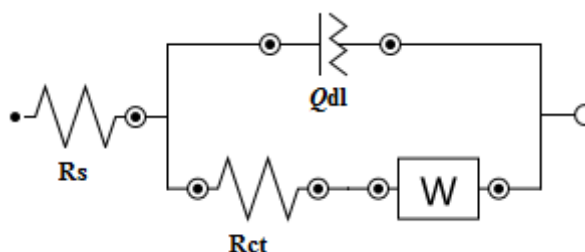
O ângulo de fase, o qual refere-se a defasagem entre a perturbação senoidal de potencial aplicada e a resposta de corrente obtido, atinge um valor máximo próximo a 60° para o sistema EI/poli(4-AFA). Para o EI este valor é bem menor e está em aproximadamente 10° . Valores próximos a 90° indicam o comportamento de um resistor ideal, indicando uma maior contribuição da componente imaginária, e consequentemente maior resistência a transferência de carga. Desta forma, temos que o sistema EI/poli(4-AFA) apresenta um caráter mais resistivo a passagem de corrente do que o EI, o que está associado a adsorção, características eletroquímicas e morfológicas do filme polimérico adsorvido.

Os diagramas de Nyquist mostram, de forma mais clara, os elementos que podem representar o circuito equivalente para simulação dos dados experimentais, facilitando-se assim a construção deste. Contudo, os diagramas de Bode são melhores utilizados nas análises destes circuitos e suas aplicações. De forma geral, em análises que se caracterizam de modo mais qualitativo, os diagramas de Nyquist são mais aplicados e utilizados.

Percebe-se que o semicírculo formado na Figura 14A pelo EI/poli(4-AFA) apresenta um maior diâmetro e, consequentemente, uma maior resistência à transferência de carga quando comparado com EI. Isso sugere que o filme polimérico adsorvido na superfície do eletrodo dificulta o processo de transferência eletrônica do par redox que ocorre na interface eletrodo/solução.

Uma vez escolhido o circuito elétrico que melhor descreve o processo, pode-se relacionar as propriedades físicas ou químicas com elementos do circuito e extrair valores numéricos de todos esses elementos através de simulações dos dados experimentais. A Figura 15 mostra o circuito elétrico equivalente que melhor se ajustou aos dados experimentais.

Figura 15: Circuito elétrico equivalente de Randles utilizado para simulação dos dados experimentais de EIE.



O circuito acima representa um circuito de Randles. Esse circuito adequadamente os processos que ocorrem na região de altas frequências. Contudo, na região de baixa frequência, para eletrodos porosos, a análise é complexa e a interpretação física da capacitância

não pode ser descrita como uma capacitância pura, sendo representada por um elemento de fase constante, Q_{dl} (CARVALHO, ANDRADE E BUENO, 2006).

Os elementos do circuito proposto representam: R_s – é a resistência da ôhmica da solução; R_{ct} – é a resistência a transferência de carga que ocorre na interface eletrodo/solução; Q_{dl} – é o elemento de fase constante que descreve a pseudocapacitância da dupla camada elétrica; e W – que é a impedância de Warburg e descreve os processos eletródicos controlados por difusão.

O qui-quadrado, χ^2 , é um parâmetro estatístico que informa o quão os dados experimentais se desviam da simulação. Em geral, para estes sistemas complexos, valores na ordem de 10^{-3} caracterizam boa conformidade entre os dados experimentais e a simulação. Dessa forma, o sistema apresentou um bom ajuste dos dados experimentais e com baixo erro estatístico. Os parâmetros numéricos obtidos através da simulação dos dados experimentais pelo circuito proposto na Figura 15 são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros obtidos a partir dos resultados de simulação de EIE para os EI e EI/poli(4-AFA).

| Parâmetros | EI | EI/poli(4-AFA) |
|---|------|----------------|
| $R_s / \Omega \text{ cm}^2$ | 187 | 193 |
| $R_{ct} / \Omega \text{ cm}^2$ | 92,5 | 2876 |
| $Q_{dl} / \mu\Omega^{-1} \text{ s}^n \text{ cm}^{-2}$ | 1,75 | 1,57 |
| n_{dl} | 0,94 | 0,96 |
| $W / \text{m}\Omega^{-1} \text{ s}^{0,5} \text{ cm}^{-2}$ | 3,18 | 2,46 |
| $\chi^2 \times 10^{-3}$ | 3,44 | 6,06 |

Pelos dados da Tabela 1, pode-se perceber que o valor de R_s praticamente não se altera, o que era de se esperar já que a solução de análise é a mesma em todas as medidas, indicando que o filme polimérico formado na superfície do eletrodo não influencia na resistência da solução.

Observa-se também que a R_{ct} do EI apresenta uma baixa resposta impedimétrica ($R_{ct} = 92,5 \Omega$), e após a etapa de eletropolimerização, verifica-se um aumento de aproximadamente 31x na resistividade do sistema ($R_{ct} = 2876 \Omega$) devido ao bloqueio parcial da transferência de carga na dupla camada elétrica, que é corroborado pelo gráfico da Figura 13A, indicando a formação do poli(4-AFA) na superfície do eletrodo.

Além disso, podemos observar que a capacitância do sistema diminui para o eletrodo modificado, e isto sugere que neste eletrodo a área eletroativa diminui, provavelmente devido a

adsorção do filme polimérico na superfície do eletrodo, diminuindo a rugosidade e porosidade do transdutor, aproximando-se mais de um capacitor perfeito, conforme observado o aumento nos valores de n_{dl} para o EI e o EI/poli(4-AFA).

A impedância de Warburg, que está relacionada aos processos difusionais que ocorrem no sistema, também diminui. Isso porque o filme formado apresenta características aniônicas e as espécies presente na solução de análise também apresenta tais características, o que leva a um impedimento dessas espécies negativas se aproximarem da interface eletrodo/solução, dificultando, assim, a difusão das mesmas.

5.5 – Imobilização do antígeno NS1

A etapa de imobilização desempenha um papel importante no desenvolvimento de um biossensor. Características como sensibilidade, seletividade e estabilidade podem melhorar significativamente dependendo da técnica utilizada.

Biossensores baseados na interação antígeno/anticorpo apresentam diversas aplicações em áreas como diagnóstico clínico de doenças (JUSTINO, DUARTE E ROCHA-SANTOS, 2016), meio ambiente (LIU *ET AL.*, 2015) e ciências farmacêuticas (CAMPANELLA, MARTINI E TOMASSETTI, 2008).

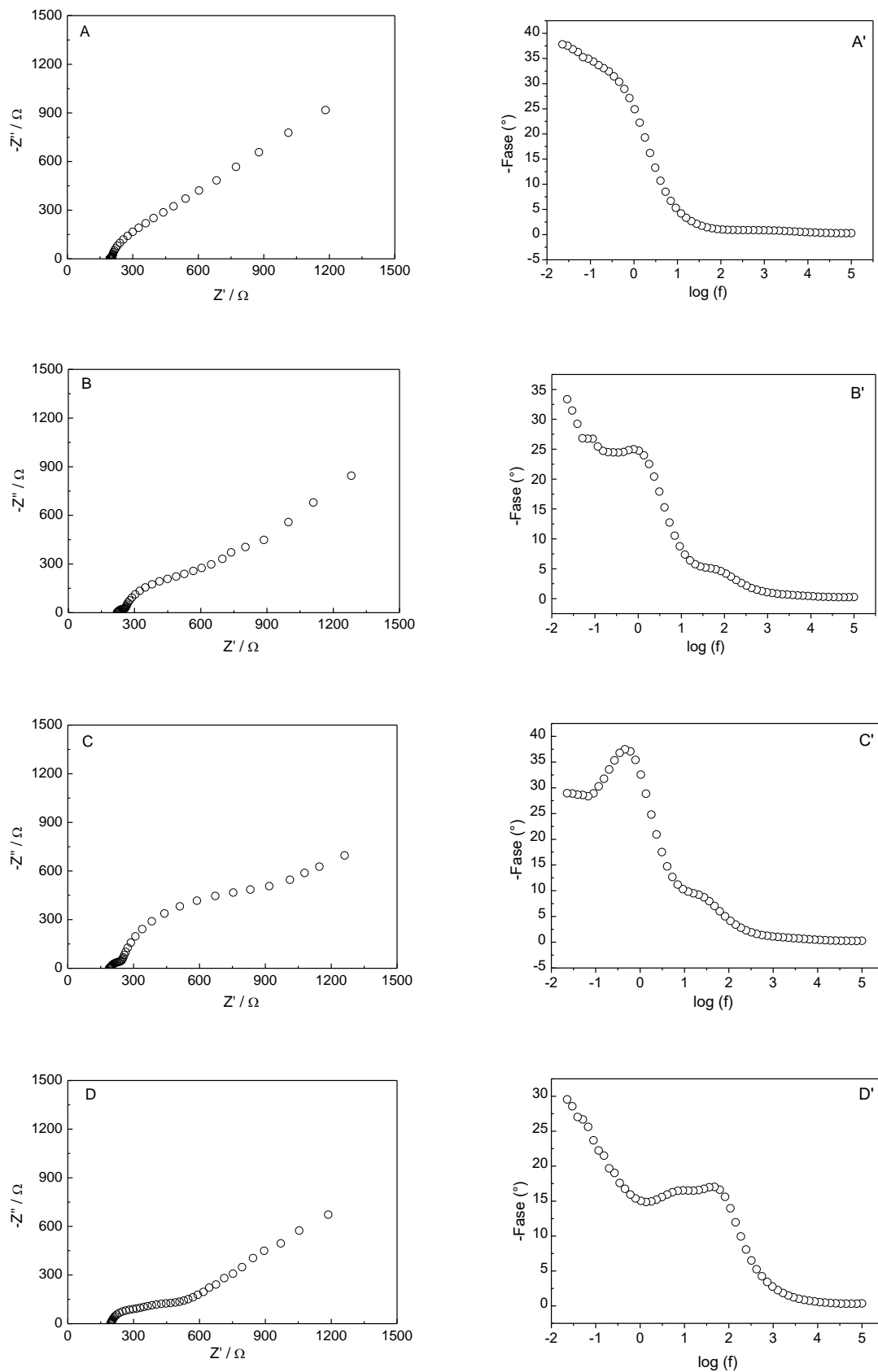
Após a etapa de eletropolimerização do monômero 4-AFA e caracterização dos filmes poliméricos obtidos, foi investigada a imobilização de antígenos NS1, bem como análise da interação e resposta do imunossensor para soros de pacientes infectados (contendo anticorpos *anti*-NS1) e soros de pacientes não infectados (ausência de anticorpos *anti*-NS1).

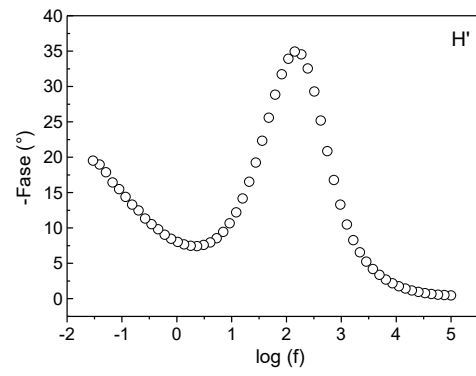
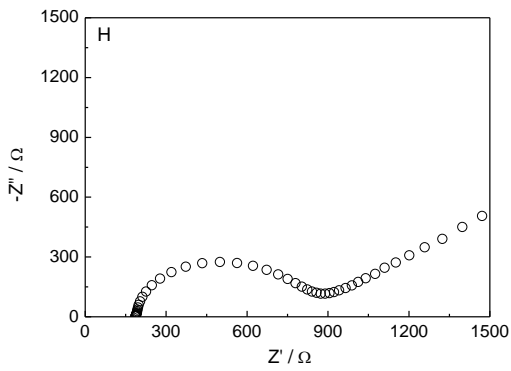
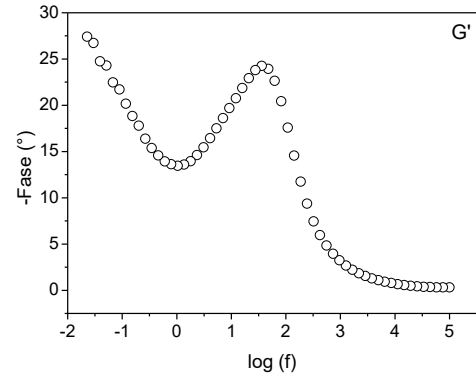
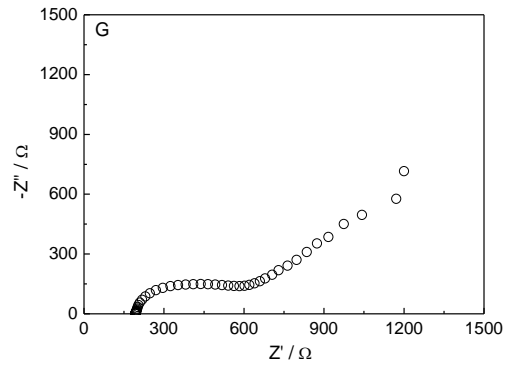
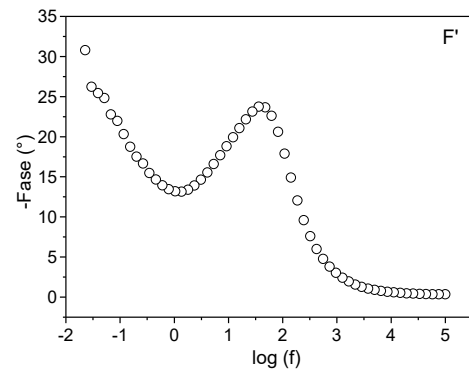
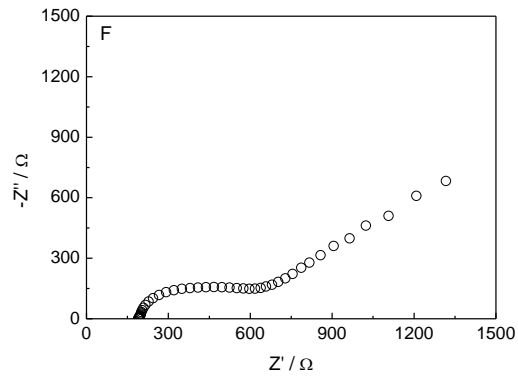
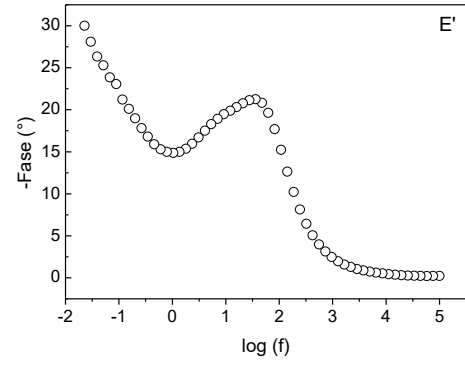
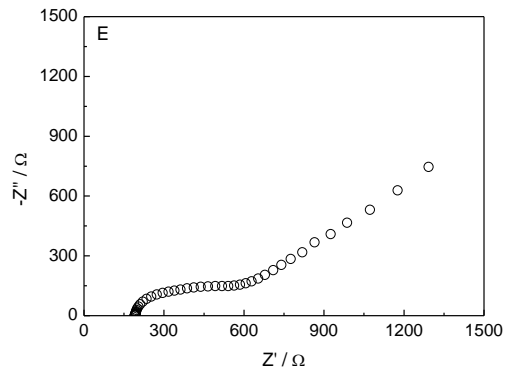
5.5.1 – Influência da concentração de NS1 imobilizado

A Figura 16 mostra os diagramas de Nyquist e Bode referentes ao estudo da concentração da proteína NS1, a fim de verificar a concentração ideal de NS1 para a imunorreação antígeno/anticorpo.

É possível notar que, na medida em que se utiliza concentrações mais diluídas do antígeno NS1, os perfis dos Diagramas de Nyquist e de Bode mudam consideravelmente. Nas concentrações de 3, 1, 0,1 mg/mL e 10 µg/mL (Figura 16 B a 16 F), percebe-se, pelos gráficos de Nyquist, a formação de um semicírculo nas baixas frequências e um outro nas frequências intermediárias, confirmados pelas duas constantes de tempo observadas pelos gráficos de Bode.

Figura 16: Diagramas de Nyquist (A - H) e Bode (A' - H') dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para o EI/poli(4-AFA) nas concentrações de NS1 de: (A) 6 mg/mL; (B) 3 mg/mL; (C) 1 mg/mL; (D) 0,1 mg/mL; (E) 10 µg/mL; (F) 1 µg/mL; (G) 0,1 µg/mL e (H) 1 ng/mL. Amplitude 10 mV. Intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. $E_{app} = OCP$.





Essa diferença nos perfis impedimétricos para as diferentes concentrações de NS1 pode ser explicada pelo fato deste antígeno ser uma proteína, que pode ser encontrada em diferentes formas: em meio intracelular encontra-se nas formas monoméricas e diméricas; e em meio extracelular encontra-se na forma hexamérica (FLEITH, 2014). Nesse sentido, em concentrações mais elevadas, a NS1 pode adsorver numa conformação mais compactada por causa do efeito de polimerização que pode ocorrer (MULLET *ET AL.*, 1997). Nesse caso, um novo filme polimérico, formado pelos antígenos NS1 pode se formar sobre a plataforma de EI/poli(4-AFA).

Esse efeito pode ser corroborado pelos dois semicírculos e as duas constantes de tempo observados nos gráficos da Figura 16. Os semicírculos e as constantes de tempo formados nas baixas frequências mostram-se mais pronunciados nas concentrações de 3, 1 e 01 mg/mL. Porém, à medida que a concentração de NS1 diminui, diminui o efeito do filme formado pelo antígeno.

Em concentrações mais diluídas, tal efeito é minimizado, garantindo-se assim que a NS1 não sofra alterações em sua estrutura o que, conseqüentemente, favorece a reação com o anticorpo *anti*-NS1. Nesse sentido, e tendo em vista a dificuldade de propor um circuito equivalente para simulação dos dados experimentais obtidos para as concentrações maiores que 1 ng/mL, optou-se por utilizar essa concentração de antígeno para as próximas etapas desse trabalho.

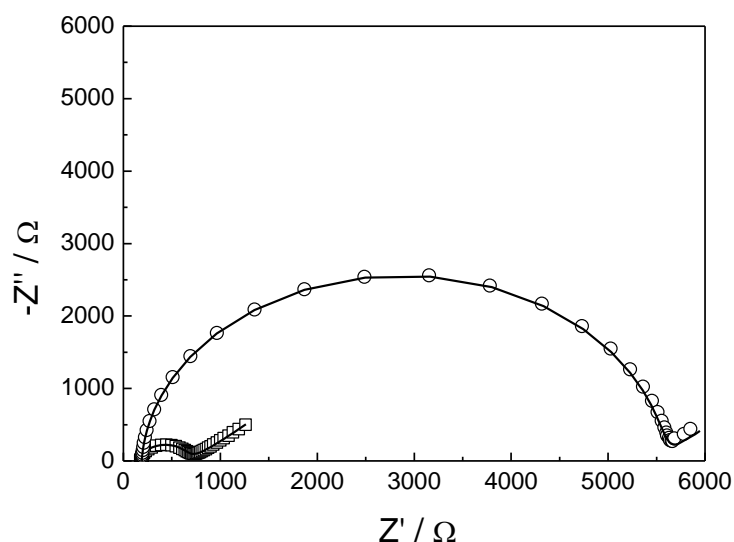
Para os gráficos obtidos na Figura 16, nas etapas de lavagem, num primeiro momento, lavou-se os eletrodos com solução tampão HBS-EP com *Tween* 20, que é um surfactante muito utilizado em ensaios biológicos, pois auxilia na remoção de ligações não específicas. Porém, no nosso caso, ao utilizar tal tampão com esse surfactante, percebeu-se que ele removia tanto as ligações não específicas quanto as específicas (NS1/*anti*-NS1), em quaisquer diluições dos soros e do antígeno.

Realizou-se um teste utilizando o tampão HBS-EP sem o *Tween* 20 conforme mostrado na Figura 17, no qual pode-se perceber que, para o EI/poli(4-AFA) lavado com tampão sem a presença do surfactante, observa-se um aumento bastante significativo no valor de R_{ct} quando comparado com EI/poli(4-AFA) lavado com tampão HBS-EP na presença do surfactante.

Esse resultado sugere que a presença do surfactante na composição do tampão pode remover tanto ligações específicas quanto inespecíficas, ou então, inibir o sinal analítico do imunossensor. Tal fato interfere diretamente na etapa de imunocomplexação, na qual observou-se que houve diferenciação entre os espectros do EI/poli(4-AFA)/NS1 e EI/poli(4-

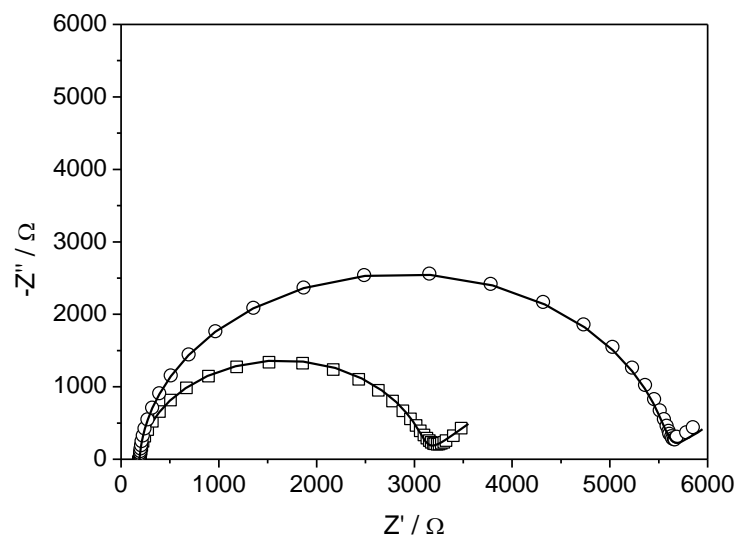
AFA)/NS1/Ac. Optou-se, portanto, em retirar o *Tween* 20 da composição do tampão HBS-EP, já que o uso desse surfactante ocasionou em possíveis retiradas de biomoléculas imobilizadas na superfície do eletrodo.

Figura 17: Diagrama de Nyquist dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para o EI/poli(4-AFA)/NS1 utilizando tampão HBS-EP (□) com *Tween* 20 e (o) sem *Tween* 20 nas etapas de lavagem. Onde: [NS1] = 1,0 ng/mL. Amplitude 10 mV. Intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. E_{app} = OCP.



O espectro de impedância do EI/poli(4-AFA) foi comparado com o EI/poli(4-AFA)/NS1 retirando-se o *Tween* 20 na composição do tampão nas etapas de lavagem, e o resultado é apresentado na Figura 18.

Figura 18: Diagrama de Nyquist dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para o (□) EI/poli(4-AFA) e para (o) EI/poli(4-AFA)/NS1. Onde: [NS1] = 1,0 ng/mL. Amplitude 10 mV. Intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. E_{app} = OCP.



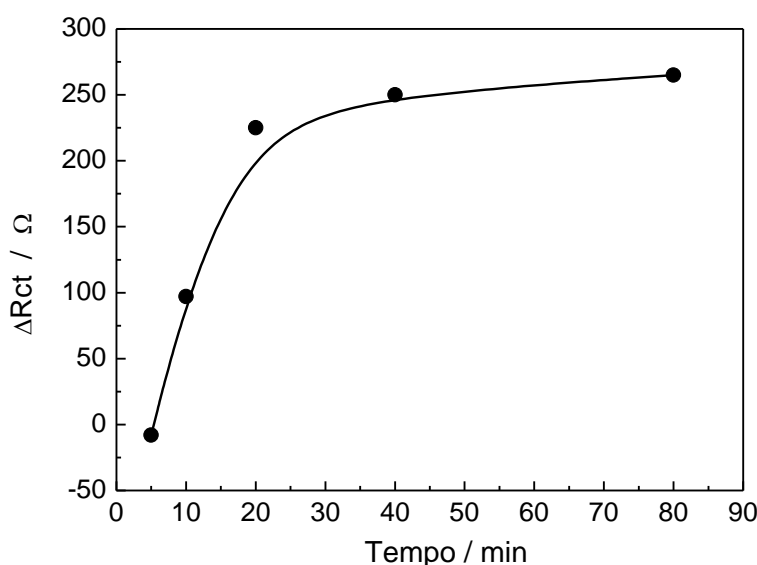
Observa-se que quando o EI/poli(4-AFA) foi imobilizado com NS1 houve um aumento de 86% no valor de R_{ct} de 2.876 Ω para 5.356 Ω , indicando a formação/adsorção de uma nova camada na superfície do eletrodo. A alta resistividade encontrada para o EI/poli(4-AFA)/NS1, no qual utilizou-se, nas etapas de lavagem, tampão HBS-EP sem o surfactante, é devida à formação de uma camada do antígeno adsorvida na superfície do eletrodo modificado com o filme poli(4-AFA).

Essa nova camada apresenta características que bloqueiam a transferência eletrônica que ocorre na interface eletrodo/solução, fato este que pode ser confirmado pelo aumento no valor de R_{ct} . Isso porque a NS1, em pH 7,40, encontra-se carregada negativamente (BLETCHLY, 2002). Como a sonda $[(FeCN)_6]^{-3/-4}$ também é aniônica, pode ocorrer a repulsão entre as espécies negativas presentes na solução e as imobilizadas na superfície do eletrodo, o que dificulta o processo redox da sonda.

5.5.2 – Otimização do tempo de imunorreação

Foi realizado um estudo sobre a influência do tempo de reação Ag/Ac a fim de verificar o tempo ideal para essa reação. Para isso, seguiu-se o procedimento descrito no item 4.2.5. A Figura 19 mostra o gráfico deste estudo por EIE, no qual foi plotado o ΔR_{ct} em função do tempo de reação. A diluição do soro positivo utilizada inicialmente foi de 1:100, mesma diluição usada no teste ELISA. A concentração de NS1 foi de 1,0 ng/mL.

Figura 19: Relação da ΔR_{ct} vs tempo de imunorreação sobre o biossensor.



Observa-se pelo gráfico, que para os tempos de 5 e de 10 minutos, uma menor diferença entre os valores de R_{ct} para o EI/poli(4-AFA)/NS1 e o EI/poli(4-AFA)/NS1/Ag+, sugerindo que o tempo de reação é curto, não sendo suficiente para que os anticorpos presentes na amostra de soro interagissem eficientemente com os antígenos imobilizados no biossensor.

Do tempo de 5 para o de 20 min observa-se um aumento na diferenciação do sinal na ordem de 28x, um aumento bastante significativo para a interação entre o imunossensor e as amostras de soros de pacientes positivos para Dengue. Por outro lado, de 20 para 80 min, o aumento no sinal foi de apenas 1,2x, ou seja, praticamente insignificante. Sendo assim, como a partir de 20 minutos de imunorreação, nota-se uma certa estabilidade no valor de ΔR_{ct} escolheu-se esse tempo para realização da imunorreação, já que não houve nenhuma diferença significativa influenciando na reatividade Ag/Ac.

A afinidade de ligação de um complexo é dependente da energia livre de Gibbs da ligação, ΔG e temperatura, T , tal como definido pela relação $K_A = e^{-\Delta G / RT}$. A mesma afinidade pode refletir muitas combinações diferentes de constantes de velocidade. A energia livre de Gibbs pode refletir similarmente muitas combinações diferentes de entalpia e mudança de entropia, dependendo da natureza química específica das forças não covalentes que predominam durante a formação do complexo e a natureza da resposta à temperatura pode dar indicações da natureza química dessas forças.

Geralmente, os complexos anticorpo-antígeno seguem princípios termodinâmicos básicos: o aumento da temperatura provoca aumento nas constantes de associação e de dissociação, mas a resposta líquida de K_{eq} pode variar porque é uma razão das duas constantes de velocidade. A sensibilidade global à temperatura de afinidade, bem como a sensibilidade à temperatura das constantes de velocidade individuais, varia entre anticorpos e é característica de cada complexo individual. Geralmente, em complexos de anticorpo-antígeno que estão em conformidade com um modelo de associação Langmuir 1:1, a constante de velocidade de dissociação é mais dependente da temperatura do que a constante de velocidade de associação (LIPSCHULTZ *ET AL.*, 2002). Não foi realizado estudo sobre a temperatura de imobilização das biomoléculas. Tendo em vista o exposto a cima e considerando que a temperatura utilizada para a imunorreação no teste ELISA é de 37 °C, adotou-se esta temperatura com padrão das análises.

5.5.3 - Efeito da diluição dos soros positivos na sensibilidade do imunossensor

Foi realizado o estudo da diluição do soro de pacientes diagnosticados como positivo para dengue, o qual foi adicionado sobre a superfície do imunossensor. Tal

investigação tem como objetivo verificar a faixa de trabalho, bem como sensibilidade da metodologia proposta. As diluições do soro foram feitas em solução tampão HBS-EP pH 7,40 a proporção de soro:tampão de: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280.

A Figura 20 mostra os Diagramas de Nyquist e Bode e a Tabela 2 mostra os dados obtidos após simulação referentes a esse estudo.

Figura 20: Diagramas de Nyquist (A) e Bode (B) dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para o EI/poli(4-AFA)/NS1 para as seguintes diluições do soro positivo (V) onde temos: (a) 1:20; (b) 1:40; (c) 1:80; (d) 1:160; (e) 1:320; (f) 1:640; (g) 1:1280 e (o) EI/poli(4-AFA)/NS1. As linhas sólidas representam a simulação dos dados experimentais para um circuito equivalente. Amplitude 10 mV; intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. [NS1] = 1 ng/mL. E_{app} = OCP.

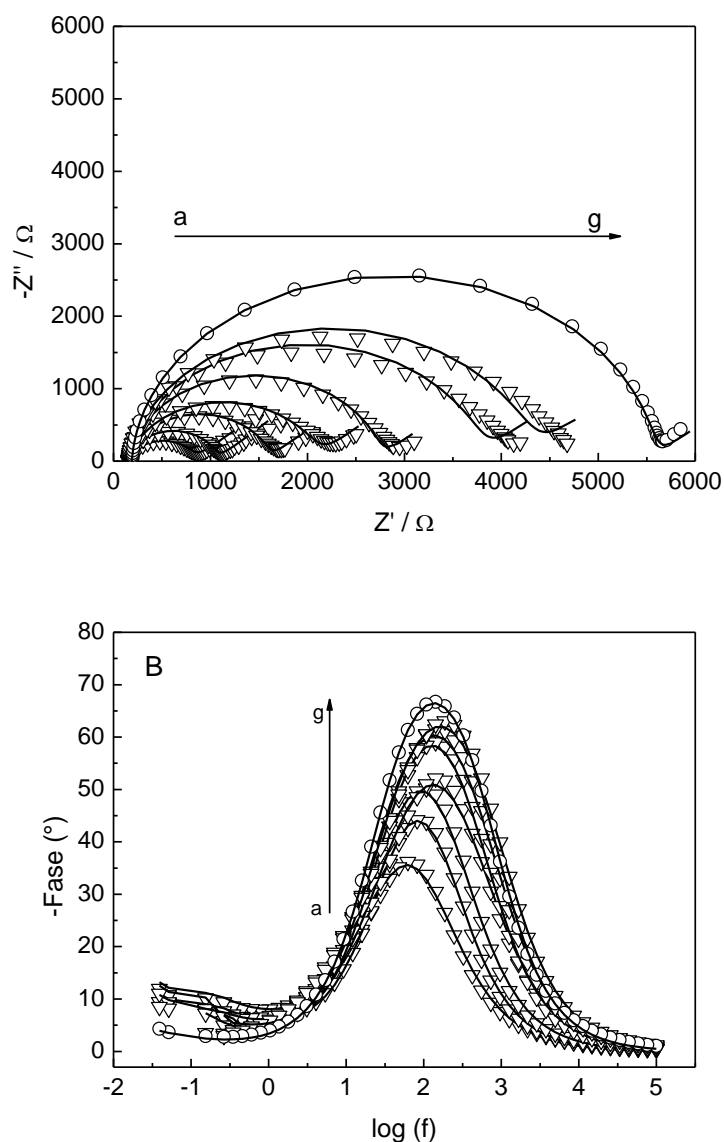


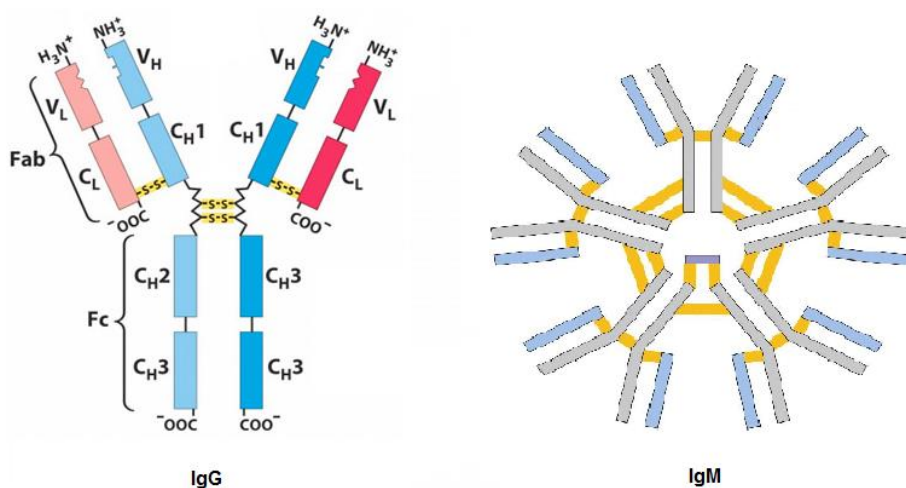
Tabela 2: Parâmetros obtidos a partir de simulação EIE para o estudo de diluição do soro positivo. [NS1] = 1 ng/mL.

| Parâmetros | NS1 | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| $R_s / \Omega \text{ cm}^2$ | 189 | 169 | 166 | 168 | 159 | 160 | 165 | 156 |
| $R_{ct} / \Omega \text{ cm}^2$ | 5.360 | 642 | 878 | 1.408 | 1.910 | 2.558 | 3.586 | 4.091 |
| $Q_{dl} / \mu\Omega^{-1} \text{ s}^n \text{ cm}^{-2}$ | 1,46 | 15,9 | 6,96 | 5,47 | 4,76 | 2,89 | 2,57 | 2,15 |
| n_{dl} | 0,969 | 0,899 | 0,958 | 0,94 | 0,889 | 0,945 | 0,925 | 0,923 |
| $W / \text{m}\Omega^{-1} \text{ s}^{0,5} \text{ cm}^{-2}$ | 3,58 | 3,37 | 3,38 | 3,19 | 2,02 | 2,95 | 1,81 | 1,35 |
| $\chi^2 \times 10^{-3}$ | 5,79 | 25,9 | 20,7 | 28,9 | 36,0 | 29,7 | 54,9 | 51,4 |

Pelos dados da Tabela 2, observa-se que não há grandes variações nos valores de R_s , sugerindo que a imunocomplexação Ag/Ac pouco interfere na resistência do sistema. Nota-se também valores maiores de Q_{dl} à medida que o fator de diluição diminui, indicando uma maior presença de pares redox na interface eletrodo/solução. Observa-se que os valores de R_{ct} aumentam com o aumento do fator de diluição, sendo maior para a diluição de 1:1280. Esperava-se, porém, um efeito contrário, onde um aumento no fator de diluição dos soros resultasse num menor valor de R_{ct} , conforme alguns trabalhos encontrados na literatura (CECCHETTO *et al.*, 2015; LUNA *et al.*, 2015; SINAWANG *et al.*, 2016).

Contudo, esses e outros trabalhos partem da imobilização do antígeno *anti*-NS1 sobre a plataforma e detectam o anticorpo da Dengue nas amostras de soros de pacientes infectados. Anticorpos IgM e IgG, encontrados em maior quantidade durante uma infecção por vírus DENV, apresentam estrutura semelhantes, sendo o IgG monomérico e o IgM, pentamérico mostrados na Figura 21.

Figura 21: Estrutura dos anticorpos IgG e IgM.



A porção Fab do anticorpo (porção na qual ocorre a ligação com o antígeno), é uma porção amino-terminal, que, dependendo do pH do meio, encontra-se positivamente carregada. Essa parte, portanto, deve estar disponível para que ocorra a imonocomplexação Ag/Ac. Já a porção Fc (parte que interage com as células de defesa do organismo), é uma porção carboxi-terminal, e no caso de desenvolvimento de imunossensores, tem que estar ligada à plataforma para que a porção Fab esteja disponível.

Nesse sentido, e considerando que a grande parte dos trabalhos encontrados na literatura sobre desenvolvimento de imunossensores impedimétricos para Dengue utilizaram a sonda ferro/ferricianeto de potássio, é de se esperar que a resistência à transferência de carga aumente para soluções mais concentradas do antígeno NS1.

O efeito observado pelos gráficos da Figura 20 pode ser explicado considerando o ponto isoelétrico (pI) da proteína NS1, que é 5,70 (BLETCHLY, 2002). Em pH 7,40, a NS1 está negativamente carregada. Como a sonda $[(\text{FeCN})_6]^{-3/-4}$ é aniônica, há uma certa resistência à transferência eletrônica na interface eletrodo/solução. Dessa forma, torna-se mais difícil a redução e/ou oxidação de espécies eletroativas na superfície do eletrodo.

Já os anticorpos IgG e IgM apresentam pI na faixa entre 6,6–7,2 e entre 5,5–7,4 (MOLECULAR, 2017), respectivamente. Em pH 7,40, que foi utilizado nesse trabalho, o IgG e IgM encontram-se eletricamente neutros. Negativamente carregada, a NS1 induz, portanto, cargas nos anticorpos *anti*-NS1 para que, dessa forma, ocorra a formação de imunocomplexos Ag/Ac. Desse modo, na medida em que vai se formando mais complexos Ag/Ac, a resistência à transferência eletrônica vai diminuindo, facilitando a troca de elétrons entre as espécies eletroativas da sonda redox e o eletrodo modificado.

Nesse sentido, em concentrações mais diluídas (maior fator de diluição), por não haver uma grande quantidade de *anti*-NS1 para formação do complexo Ag/Ac, o R_{ct} observado é maior, se aproximando mais do valor de R_{ct} do EI/poli(4-AFA)/NS1, quando comparado às concentrações mais elevadas (menor fator de diluição), pois apresentam uma maior quantidade de *anti*-NS1 e, conseqüentemente, uma maior quantidade de complexos Ag/Ac é formada, sendo observado um R_{ct} menor.

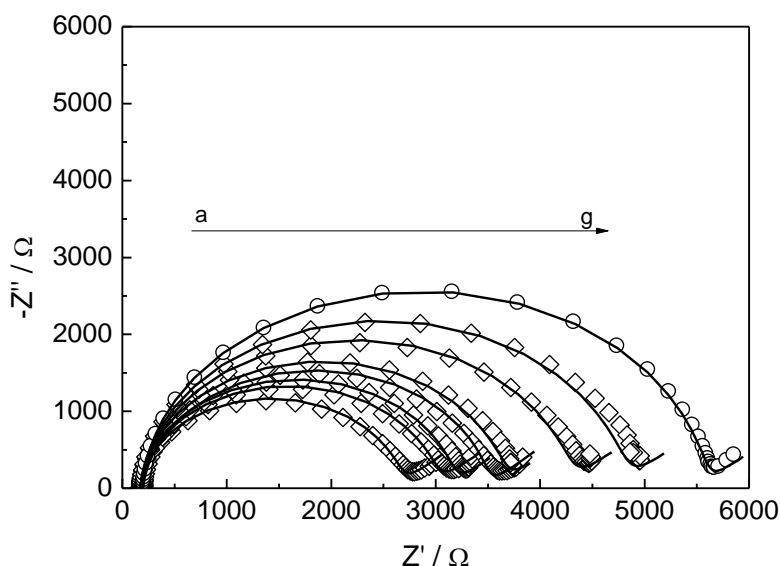
5.5.4 – Efeito da diluição das amostras de soros negativos

Realizou-se um estudo com amostras de soro negativos, ou seja, pacientes com diagnostico negativo para dengue, a fim de verificar a presença de interações não específicas entre as biomoléculas presente no soro e a proteína NS1, bem como possíveis interferentes.

Para isso foram feitas diluições das amostras do soro negativo nas mesmas condições daquelas realizadas para o soro positivo (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280).

A Figura 22 mostra os gráficos de Nyquist e a Tabela 3 mostra os valores de R_{ct} (que é um dos parâmetros mais utilizados nos trabalhos encontrados na literatura para avaliação de imunossensores impedimétricos) obtidos nesse estudo comparando com os valores de R_{ct} obtidos dos estudos de diluição do soro positivo.

Figura 22: Diagrama de Nyquist dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para o EI/poli(4-AFA)/NS1 para as seguintes diluições dos soros negativos (\diamond) onde temos: (a) 1:20; (b) 1:40; (c) 1:80; (d) 1:160; (e) 1:320; (f) 1:640; (g) 1:1280 e (o) EI/poli(4-AFA)/NS1. As linhas sólidas representam a simulação dos dados experimentais para um circuito equivalente. Amplitude 10 mV; intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. [NS1] = 1 ng/mL. E_{app} = OCP.



Observa-se pelo gráfico da Figura 22 que para as diluições estudadas, os valores de R_{ct} diminuem para soluções de soro negativo mais concentradas (menor fator de diluição). Porém, esses valores se aproximam mais do R_{ct} do EI/poli(4-AFA)/NS1 (5.360 Ω) quando comparado com o estudo de diluição do soro positivo.

Pela análise da Tabela 3, pode-se observar que tanto o soro positivo quanto o soro negativo apresentaram resposta analítica, porém a diferenciação do sinal obtido para as amostras de soro positivas foi significativamente maior que o sinal das amostras negativas quando comparadas ao sinal da NS1.

Tabela 3: Comparação entre os valores de R_{ct} para resposta do imunossensor frente a mostras de soros positivas e negativas para Dengue.

| Fator de diluição | R_{ct} (Ω) Soro Positivo | R_{ct} (Ω) Soro Negativo | Diferença (Ω) |
|--------------------------|--|--|--|
| 1:20 | 642 | 2.463 | 1.821 |
| 1:40 | 878 | 2.799 | 1.921 |
| 1:80 | 1.408 | 2.964 | 1.556 |
| 1:160 | 1.910 | 3.274 | 1.364 |
| 1:320 | 2.558 | 3.437 | 879 |
| 1:640 | 3.586 | 4.065 | 479 |
| 1:1280 | 4.091 | 4.585 | 494 |
| NS1 | 5360 Ω | | |

Os sinais apresentados no estudo de diluição do soro negativo podem ser devido a substâncias presentes nos soros de pacientes, como albumina, creatinina, glicose e ácido salicílicos que, dependendo de suas concentrações, podem afetar os resultados do teste, gerando um sinal analítico que não esteja relacionado ao evento de imunocomplexação Ag/Ac (falso positivo). Anticorpos de outras classes, como IgA e IgE, também podem interagir de modo inespecífico com a NS1.

É possível observar que o soro negativo apresenta valores de R_{ct} elevados, mais próximos do R_{ct} do NS1. Esse sinal obtido no estudo do soro negativo indica a ocorrência de interações não específicas entre a NS1 imobilizada e anticorpos não específicos para DENV.

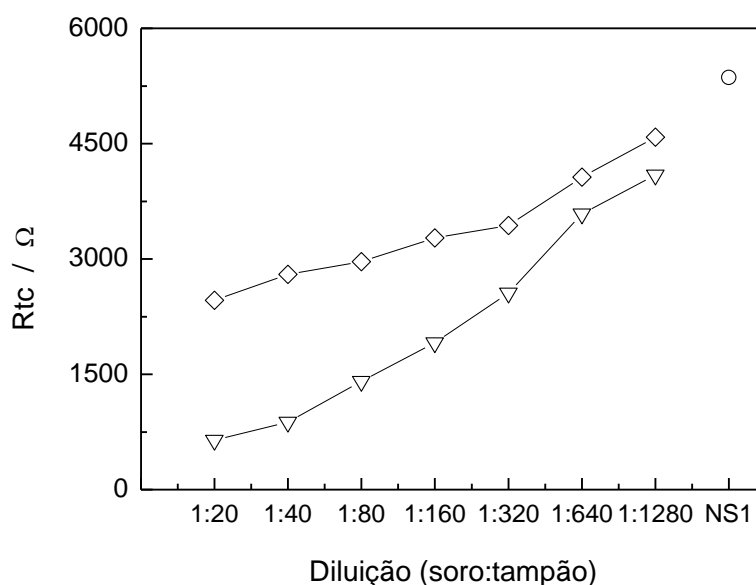
Comparando os valores da Tabela 3, observa-se que mesmo para a amostra mais diluída (1:1280) houve uma diferenciação de aproximadamente 12% entre valores de R_{ct} do soro negativo para o soro positivo. Para a diluição de 1:20, nota-se uma diminuição do sinal de aproximadamente 24% para o soro positivo e de 14% para o soro negativo, quando comparado com o R_{ct} do EI/poli(4-AFA)/NS1.

A Figura 23 mostra claramente a variação na resposta do valor de R_{ct} em função da diluição os soros positivos e negativos para a dengue, comparando-os com o valor para NS1.

É possível notar a diferenciação do sinal (positivo e negativo) de forma mais acentuada para as menores diluições dos soros. Na diluição de 1:20 a diferença entre as respostas é de aproximadamente 4x (cerca de 280%). Contudo, com o aumento da diluição a resposta entre ambos os soros se aproximam entre si, mostrando nestes casos que não é possível a distinção e monitoramento da doença em soluções dos soros muito diluídas. Além disto, com o aumento da diluição a resposta também se aproximam do sinal obtido somente para a NS1,

ou seja, sem a presença dos anticorpos, indicando que a contribuição da interação antígeno/anticorpo pouco interfere na resposta do sinal, e isto pode estar diretamente relacionado com a quantidade de material presente na amostra que implica no baixo sinal analítico observado.

Figura 23: Resposta dos valores de resistência a transferência de carga para o imunossensor em função da diluição de soros positivos e negativos para a dengue. Onde tem-se a resposta para: (∇) soros positivos; (\diamond) soros negativos e (o) NS1.



Sendo assim, observamos que, para diluições do soro de até 1:160 é possível distinguir com segurança o diagnóstico positivo e negativo para dengue em amostras de pacientes humanos utilizando o imunossensor proposto com uma diferenciação entre os sinais de aproximadamente 71%.

A Tabela 4 mostra alguns estudos descritos na literatura relacionados ao diagnóstico de Dengue. Observa-se que, praticamente em todos os casos apresentados, o princípio de funcionamento baseia-se na detecção da NS1, mostrando baixos limites de detecção, e uma faixa de trabalho considerável.

Em nossa proposta de trabalho não foi possível prever o limite de detecção para o sistema, uma vez que, a análise é realizada mediante o reconhecimento de anticorpos *anti*-NS1 presentes em amostras de soro humano. Sendo assim, como as amostras de soro foram obtidas de pacientes diagnosticados com dengue, e considerando que a quantidade de anticorpos pode variar de indivíduo para indivíduo, a dosagem destes anticorpos não foi realizada, e devido a isto, a concentração dos mesmos não foi considerada, tendo-se, portanto, apenas realizado estudos com a diluição dos soros. Entendemos que, a proposta do trabalho é o desenvolvimento

de um sistema de diagnóstico de dengue de fácil utilização, e que possa confirmar ou não o diagnóstico da doença, sem a necessidade de quantificação dos anticorpos, ou seja, a ideia é a realização de um teste qualitativo.

Tabela 4: Estudos reportados na literatura para o diagnóstico da dengue, relacionando o tipo do transdutor com o analito, limite de detecção e faixa de trabalho.

| Transdutor | Analito | Limite de detecção | Faixa de trabalho | Referência |
|----------------------|------------|-----------------------|-------------------|--|
| Eletroquímico | NS1 | 12 ng/mL | 40 a 2000 ng/mL | (DIAS, A. C. M. S. <i>ET AL.</i> , 2013) |
| | Proteína E | 0,94 ng/mL | 1 a 175 ng/mL | (CAVALCANTI <i>ET AL.</i> , 2012) |
| | NS1 | 15 ng/mL | 40 a 600 ng/mL | (SILVA <i>ET AL.</i> , 2014) |
| | NS1 | 30 ng/mL | 10 a 1000 ng/mL | (CECCHETTO <i>ET AL.</i> , 2015) |
| | NS1 | 0,5 ng/mL | 1 a 25 ng/mL | (SINAWANG <i>ET AL.</i> , 2016) |
| Piezelétrico | NS1 | 740 ng/mL | ----- | (WU <i>ET AL.</i> , 2005) |
| | NS1 | ----- | 0,1 – 10 µg/mL | (TAI <i>ET AL.</i> , 2006) |
| Óptico | IgM | 12 pg/mm ² | ----- | (WONG <i>ET AL.</i> , 2014) |
| | IgM | 1:10 ⁶ | ----- | (ATIAS <i>ET AL.</i> , 2009) |
| | RNA | 10 pmol/L | ----- | (KWAKYE E BAEUMNER, 2003) |
| | RNA | 0,125 nM | ----- | (ZAYTSEVA, MONTAGNA E BAEUMNER, 2005) |

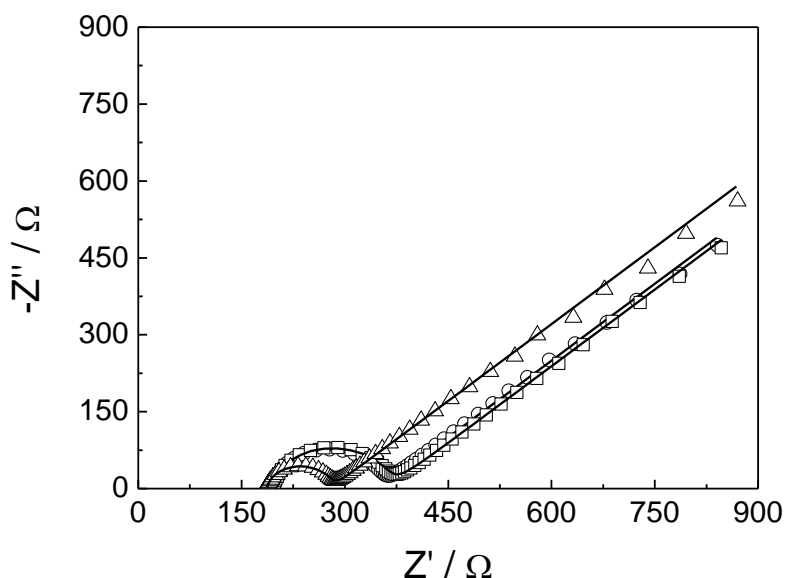
O limite de detecção é um fator muito importante em análises químicas, contudo, no presente trabalho torna-se secundária. Além disto, a imobilização da NS1 sobre a plataforma funcionalizada foi realizada utilizando-se a concentração de 1,0 ng/mL, uma quantidade extremamente pequena, a qual com certeza, deve apresentar quantidade inferior após imobilização. Em diluições de 1:1280 temos um fator de diluição de 1280x, ou seja, uma quantidade bem pequena considerando-se a quantidade de anticorpos que podem estar presentes no soro humano.

5.5.5 – Importância do filme poli(4-AFA) na imobilização de biomoléculas

Para verificar a importância da plataforma funcionalizada com o filme polimérico derivado do 4-AFA, foi realizada a imobilização da NS1 diretamente na superfície do EI, bem

como interação desta com amostras de soros positivos para Leishmaniose visceral canina. A Figura 24 mostra o resultado desse experimento.

Figura 24: Diagramas de Nyquist dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para: (Δ) EI; (\circ) EI/NS1 e (\square) EI/NS1/Soro Positivo. As linhas sólidas representam a simulação dos dados experimentais para um circuito equivalente. Amplitude 10 mV; intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. Diluição soro: 1:160. [NS1] = 1 ng/mL. E_{app} = OCP.



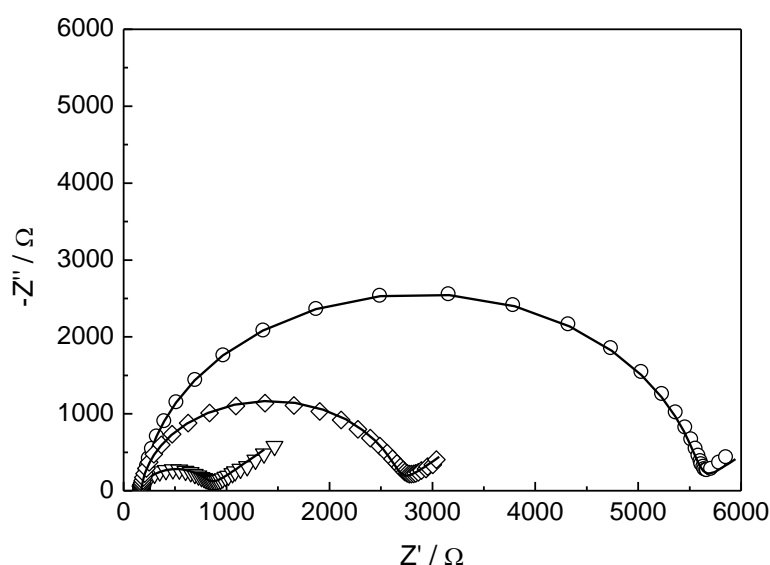
Como pode-se perceber, observa-se um pequeno aumento nos valores de R_{ct} , comparando-se o EI com o EI/NS1 com o EI/NS1/soro positivo imobilizado diretamente na superfície do eletrodo, sem presença do filme poli-4(AFA), o que pode estar realizado a uma fraca adsorção do componente biológico sobre a superfície transdutora. O valor da resistência à transferência eletrônica aumenta em cerca de 7% (de 156 para 167 Ω , com $\Delta R_{ct} = 11 \Omega$) do EI/NS1 para o EI/NS1/Soro positivo, evidenciando que o sistema não é capaz de reconhecer o analito na amostra. Comparando esse resultado aqueles mostrados na Figura 20 (ver também Figura 25), pode-se observar que a presença do filme polimérico formado na superfície do eletrodo influencia diretamente no sinal analítico mensurado, resultando num maior valor de R_{ct} . Isso mostra a importância da plataforma funcionalizada na etapa de imobilização de biomoléculas, que gera um sinal analítico maior.

A presença do filme poli(4-AFA) formando na superfície do eletrodo garante uma melhor estabilidade para a NS1 imobilizada. Isso porque, durante a etapa de eletropolimerização os grupos funcionais do monômero são mantidos, favorecendo a adsorção do antígeno na plataforma funcionalizada, o que também garante que não haja distorções na

conformação da NS1. Com isso, mais biomoléculas podem ser imobilizadas de forma mais efetiva, já que os efeitos de dessorção também são minimizados.

A Figura 25 mostra os gráficos com os melhores resultados obtidos com o imunossensor proposto.

Figura 25: Diagramas de Nyquist dos espectros de impedância obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio 5,0 mM em KCl 0,10 M para: (o) EI/poli(4-AFA)/NS1; (▽) EI/poli(4-AFA)/NS1/Soro Positivo e (◇) EI/poli(4-AFA)/NS1/Soro Negativo. As linhas sólidas representam a simulação dos dados experimentais para um circuito equivalente. Amplitude 10 mV; intervalo de frequência 10^5 a 10^{-2} Hz. $E_{app} = OCP$.



Observa-se uma diferenciação bastante significativa entre as resistências de transferência de carga referente ao EI/poli(4-AFA)/NS1 e o EI/poli(4-AFA)/NS1/soro positivo, mostrando uma boa sensibilidade do sistema proposto. Para o soro negativo, nota-se um valor de R_{ct} maior comparando-se com o R_{ct} do soro positivo. Isso é devido a interferentes presentes na matriz da amostra que ligam de forma inespecífica ao antígeno.

Em comparação ao sinal do imunossensor (NS1) podemos dizer que houve uma queda de 88% em relação as amostras positivas, e de 54% para as negativas. Além disto, uma diferenciação de 74% entre os sinais positivos e negativos mostram a sensibilidade do sistema proposto.

Tais resultados são promissores e mostram a capacidade do imunossensor em poder reconhecer pacientes positivos e negativos ao diagnóstico da dengue. Além disto, as análises foram realizadas sem nenhum tratamento prévio das amostras, o que diminui possíveis etapas de pré-tratamento, além do diagnóstico poder ser realizado em sem a necessidade de mão de obra e laboratórios com equipamentos especializados.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi investigado o uso de uma plataforma funcionalizada com filme polimérico derivado do ácido 4-aminofenilacético para desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico para diagnóstico de dengue utilizando-se eletrodo impresso de grafite.

A caracterização do filme poli(4-AFA) foi feita por VC e EIE, na qual foi possível verificar a presença do filme formado na superfície do eletrodo, comparando as etapas antes e após a eletropolimerização.

A etapa de imobilização da proteína NS1 também foi avaliada por EIE, na qual foi possível comprovar a interação da biomolécula com o filme derivado do ácido 4-AFA. A concentração ideal de NS1 foi otimizada, e foi possível verificar que, em concentrações mais baixas a NS1 não sofre efeitos de polimerização peptídica, o que favorece a complexação com anticorpos anti-NS1, já que sua estrutura se mantém inalterada na etapa de imobilização.

Um estudo sobre o tempo de imunorreação foi realizado, onde foi possível perceber que 20 minutos são suficientes para que ocorra a imunocomplexação Ag/Ac. Tempos maiores apresentaram resultados bem próximos ao tempo de 20 minutos.

A aplicação da plataforma proposta foi verificada utilizando amostras reais de soros de pacientes com dengue. Foi possível concluir que a formação do imunocomplexo Ac/Ag altera a resposta eletroquímica do sistema nas diferentes diluições testadas, permitindo detectar a presença de anticorpos anti-NS1 nas amostras de soro.

Foi realizado também testes com amostras de soro negativo, a fim de verificar possíveis interações inespecíficas presentes nas amostras dos soros. Verificou-se que o soro negativo apresentou respostas bem inferiores quando comparadas às respostas do estudo com o soro positivo, indicando a seletividade do método proposto.

Por fim, foi possível avaliar um imunossensor que possa ser capaz de diagnosticar dengue na fase inicial da doença. A possibilidade de miniaturização do sistema é uma das características dos biossensores eletroquímicos que se destacam pela possibilidade de utilização onde o acesso à saúde é precário, o que viabiliza o controle e tratamento adequados de doenças como a dengue.

O uso dessa plataforma mostrou-se bastante promissor no desenvolvimento de um imunossensor para diagnóstico de dengue. Foi possível a aplicação do biossensor em amostras reais de pacientes infectados com o vírus DENV, e uma comparação foi realizada com soros de pacientes não infectados, no qual observou-se que para diluições até 1:160 é possível distinguir,

com cerca de 71% de diferença entre soro positivo e negativo, um paciente infectado de um paciente sadio. Essa diferença também sugere a seletividade do dispositivo desenvolvido.

O trabalho visa contribuir de forma significativa na área da saúde, especificamente no diagnóstico precoce da dengue, visando o início de um tratamento rápido e adequado dos pacientes infectados.

Como perspectivas futuras, tem-se a otimização dos parâmetros de construção do transdutor como: número de ciclos de potencial, pH da solução monomérica, velocidade de varredura durante a eletropolimerização, tipo de eletrólito suporte utilizado na eletropolimerização; temperatura de imobilização da NS1 e da imunorreação; bem como a caracterização do filme por microscopia eletrônica de varredura e por VC e EIE utilizando a sonda catiônica cloreto de hexamino-rutênio $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$.

Todas estas otimizações podem garantir uma melhor performance do imunossensor de forma a minimizar efeitos de interferentes e reações inespecíficas indesejáveis, melhorando a resposta do dispositivo proposto.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, B.; MAJUMDAR, S. Polymers in sensor applications. **Progress in polymer science**, v. 29, n. 7, p. 699-766, 2004.
- AHMED, N. H.; BROOR, S. Comparison of NS1 antigen detection ELISA, real time RT-PCR and virus isolation for rapid diagnosis of dengue infection in acute phase. **Journal of vector borne diseases**, v. 51, n. 3, p. 194, 2014.
- AHUJA, T.; MIR, I. A.; KUMAR, D. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 791-805, 2007.
- ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.
- ALVES, R. D. F.; DA SILVA, A. G.; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L. Synthesis and characterization of a material derived from 4-mercaptobenzoic acid: A novel platform for oligonucleotide immobilization. **Talanta**, v. 165, p. 69-75, 2017.
- ATIAS, D.; LIEBES, Y.; CHALIFA-CASPI, V.; BREMAND, L.; LOBEL, L.; MARKS, R. S.; DUSSART, P. Chemiluminescent optical fiber immunosensor for the detection of IgM antibody to dengue virus in humans. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 140, n. 1, p. 206-215, 2009.
- AVIRUTNAN, P.; PUNYADEE, N.; NOISAKRAN, S.; KOMOLTRI, C.; THIEMMECA, S.; AUETHAVORNANAN, K.; JAIRUNGSRI, A.; KANLAYA, R.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; PUTTIKHUNT, C. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 8, p. 1078-1088, 2006.
- BARBOSA JR, D. S. J.; SIQUEIRA JR, J. B.; COELHO, G. E.; VILARINHOS, P.; PIMENTA JR, F. G. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. **Epidemiological bulletin**, v. 23, n. 1, p. 3, 2002.
- BARIOTO, V. D. C. R. **Influência do contra-íon usado na eletrossíntese do polipirrol em sua resposta como biossensor eletroquímico após a imobilização da polifenol oxidase**. 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- BARKHAM, T. M.; CHUNG, Y. K.; TANG, K. F.; OOI, E. E. The performance of RT-PCR compared with a rapid serological assay for acute dengue fever in a diagnostic laboratory. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 2, p. 142-148, 2006.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue in Brazil: epidemiological situation and contribution to a research agenda. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.

BLETCHLY, C. **Antigenic and structural analysis of the NS1 glycoprotein of dengue virus**. 2002. 220 p. Tese (Doctor of Philosophy) - Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade de Queensland, Australia, 2002.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

BRITO-MADURRO, A. G.; FERREIRA, L. F.; VIEIRA, S. N.; ARIZA, R. G.; GOULART FILHO, L. R.; MADURRO, J. M. Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix. **Journal of materials science**, v. 42, n. 9, p. 3238-3243, 2007.

BUČKO, M.; MISLOVIČOVÁ, D.; NAHÁLKA, J.; VIKARTOVSKÁ, A.; ŠEFČOVIČOVÁ, J.; KATRLÍK, J.; TKÁČ, J.; GEMEINER, P.; LACÍK, I.; ŠTEFUCA, V. Immobilization in biotechnology and biorecognition: from macro-to nanoscale systems. **Chemical Papers**, v. 66, n. 11, p. 983-998, 2012.

CAMPANELLA, L.; MARTINI, E.; TOMASSETTI, M. New immunosensor for Lactoferrin determination in human milk and several pharmaceutical dairy milk products recommended for the unweaned diet. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 2, p. 278-287, 2008.

CARVALHO, L. A. D.; ANDRADE, A. R. D.; BUENO, P. R. Electrochemical impedance spectroscopy applied in the study of heterogeneous reactions at dimensionally stable anodes. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2006.

CAVALCANTI, I. T.; SILVA, B. V. M.; PERES, N. G.; MOURA, P.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; GUEDES, M. I. F.; DUTRA, R. F. A disposable chitosan-modified carbon fiber electrode for dengue virus envelope protein detection. **Talanta**, v. 91, p. 41-46, 2012.

CECCHETTO, J.; CARVALHO, F. C.; SANTOS, A.; FERNANDES, F. C. B.; BUENO, P. R. An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 213, p. 150-154, 2015.

CUNHA, M. D. P.; GUIMARÃES, V. N.; SOUZA, M.; DE PAULA CARDOSO, D. D. D.; DE ALMEIDA, T. N. V.; DE OLIVEIRA, T. S.; FIACCADORI, F. S. Phylodynamics of DENV-1 reveals the spatiotemporal co-circulation of two distinct lineages in 2013 and multiple introductions of dengue virus in Goiás, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 130-134, 2016.

DARWISH, N. T.; ALIAS, Y. B.; KHOR, S. M. An introduction to dengue-disease diagnostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, n. 0, p. 45-55, 2015.

DIAS. **Desenvolvimento de plataformas sensoras para detecção eletroquímica do antígeno NS1 do vírus da dengue**. 2015. 134 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

DIAS; ALMEIDA, S. C. L.; HAES, T. M.; MOTA, L. M.; RORIZ-FILHO, J. S. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 43, n. 2, p. 143-152, 2010.

DIAS; GOMES-FILHO, S. L.; SILVA, M. M.; DUTRA, R. F. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 44, p. 216-221, 2013.

DIAS, A. C. M. S.; GOMES-FILHO, S. L. R.; SILVA, M. M. S.; DUTRA, R. F. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 44, p. 216-221, 2013.

DU, L.; WU, C.; PENG, H.; ZOU, L.; ZHAO, L.; HUANG, L.; WANG, P. Piezoelectric olfactory receptor biosensor prepared by aptamer-assisted immobilization. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 187, p. 481-487, 2013.

FERREIRA, H. A.; GRAHAM, D. L.; FELICIANO, N.; CLARKE, L. A.; AMARAL, M. D.; FREITAS, P. P. Detection of cystic fibrosis related DNA targets using AC field focusing of magnetic labels and spin-valve sensors. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 41, n. 10, p. 4140-4142, 2005.

FERREIRA, L. F.; BOODTS, J. F.; BRITO - MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Gold electrodes modified with poly (4 - aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide. **Polymer International**, v. 57, n. 4, p. 644-650, 2008.

FERREIRA, L. F.; SANTOS, C. C.; DA CRUZ, F. S.; CORREA, R. A. M. S.; VERLY, R. M.; DA SILVA, L. M. Preparation, characterization, and application in biosensors of functionalized platforms with poly(4-aminobenzoic acid). **Journal of materials science**, v. 50, n. 3, p. 1103-1116, 2015.

FERREIRA, L. F.; SOUZA, L. M.; FRANCO, D. L.; CASTRO, A. C. H.; OLIVEIRA, A. A.; BOODTS, J. F. C.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 1-2, p. 46-52, 2011.

FIGUEIREDO, A. **Imunossensores potenciométricos para a detecção da proteína NS1 do vírus da dengue**. 2013. 115 p. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

GÓMEZ-DANTÉS, H.; WILLOQUET, J. R. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. **Cadernos de saúde pública**, v. 25, p. S19-S31, 2009.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VOEROES, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of medical research**, v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in polymer science**, v. 32, n. 8, p. 876-921, 2007.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. S7-S16, 2010.

HARSÁNYI, G. Polymer films in sensor applications: a review of present uses and future possibilities. **Sensor Review**, v. 20, n. 2, p. 98-105, 2000.

HASAN, A.; NURUNNABI, M.; MORSHED, M.; PAUL, A.; POLINI, A.; KUILA, T.; AL HARIRI, M.; LEE, Y.-K.; JAFFA, A. A. Recent advances in application of biosensors in tissue engineering. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

HERNÁNDEZ, C. A.; OSMA, J. F. Whole cell biosensors. **Biosensors: Recent Advances and Mathematical Challenges**, p. 51-96, 2014.

HOLFORD, T. R.; DAVIS, F.; HIGSON, S. P. Recent trends in antibody based sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 34, n. 1, p. 12-24, 2012.

HUNSPERGER, E. A.; YOKSAN, S.; BUCHY, P.; NGUYEN, V. C.; SEKARAN, S. D.; ENRIA, D. A.; VAZQUEZ, S.; CARTOZIAN, E.; PELEGRINO, J. L.; ARTSOB, H. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 10, p. e3171, 2014.

INZELT, G. **Conducting polymers: a new era in electrochemistry**. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 3642276202.

IOST, R. M.; CRESPILO, F. N. Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: applications in biosensing and bioelectronics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, n. 1, p. 1-10, 2012.

IVANOV, S.; TSAKOVA, V.; MIRSKY, V. M. Conductometric transducing in electrocatalytical sensors: Detection of ascorbic acid. **Electrochemistry communications**, v. 8, n. 4, p. 643-646, 2006.

JÚNIOR, G. C.; SILVA, A. P. S.; GUINESI, L. S. Synthesis, characterization and electropolymerization of a new polypyrrole iron (II) Schiff-base complex. **Polyhedron**, v. 23, n. 11, p. 1953-1960, 2004.

JUSTINO, C. I. L.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. Chapter Three - Immunosensors in Clinical Laboratory Diagnostics. In: GREGORY, S. M. (Ed.). **Advances in Clinical Chemistry**: Elsevier, v. Volume 73, 2016. p.65-108. ISBN 0065-2423.

KELLY, S.; COMPAGNONE, D.; GUILBAULT, G. Amperometric immunosensor for lactate dehydrogenase LD-1. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 13, n. 2, p. 173-179, 1998.

KOYUN, A.; AHLATCOLU, E.; KOCA, Y.; KARA, S. **Biosensors and their principles**. InTech: Rijeka, Croatia, 2012. ISBN 9535106090.

KUMBHAT, S.; SHARMA, K.; GEHLOT, R.; SOLANKI, A.; JOSHI, V. Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 2, p. 255-259, 2010.

KWAKYE, S.; BAEUMNER, A. A microfluidic biosensor based on nucleic acid sequence recognition. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 7, p. 1062-1068, 2003.

LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Microbial biosensors. **Analytica chimica acta**, v. 568, n. 1, p. 200-210, 2006.

LIBRATY, D. H.; ENDY, T. P.; HOUNG, H.-S. H.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; SUNTAYAKORN, S.; CHANSIRIWONGS, W.; VAUGHN, D. W.; NISALAK, A.; ENNIS, F. A. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 9, p. 1213-1221, 2002.

LIMA, M. D. R. Q. **Avaliação de testes de captura de antígeno NS1 para o diagnóstico precoce das infecções por dengue**. 2009. 131 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

LIPSCHULTZ, C. A.; YEE, A.; MOHAN, S.; LI, Y.; SMITH - GILL, S. J. Temperature differentially affects encounter and docking thermodynamics of antibody-antigen association. **Journal of Molecular Recognition**, v. 15, n. 1, p. 44-52, 2002.

LIU, L.; XU, D.; HU, Y.; LIU, S.; WEI, H.; ZHENG, J.; WANG, G.; HU, X.; WANG, C. Construction of an impedimetric immunosensor for label-free detecting carbofuran residual in agricultural and environmental samples. **Food Control**, v. 53, p. 72-80, 2015.

LÖWY, I. Representing and intervening in public health: viruses, mosquitoes and Rockefeller Foundation experts in Brazil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 5, n. 3, p. 647-677, 1999.

MCQUADE, D. T.; PULLEN, A. E.; SWAGER, T. M. Conjugated polymer-based chemical sensors. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 7, p. 2537-2574, 2000.

MORGAN, C. L.; NEWMAN, D. J.; PRICE, C. Immunosensors: technology and opportunities

in laboratory medicine. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 193-209, 1996.

MULLET, M.; FIEVET, P.; BOUHALLAB, S.; REGGIANI, J.; PAGETTI, J. Study of the adsorption of a hydrophobic peptide onto carbon surfaces by capacitance measurements. **Journal of membrane science**, v. 128, n. 2, p. 243-254, 1997.

NAJIOULLAH, F.; VIRON, F.; CÉSAIRE, R. Evaluation of four commercial real-time RT-PCR kits for the detection of dengue viruses in clinical samples. **Virology journal**, v. 11, n. 1, p. 164, 2014.

NESTOROWICZ, A.; CHAMBERS, T. J.; RICE, C. M. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2A/2B cleavage site: effects on proteolytic processing, viral replication, and evidence for alternative processing of the NS2A protein. **Virology**, v. 199, n. 1, p. 114-123, 1994.

NEWMAN, J. D.; SETFORD, S. J. Enzymatic biosensors. **Molecular biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 249-268, 2006.

NGUYEN, B. T. T.; PEH, A. E. K.; CHEE, C. Y. L.; FINK, K.; CHOW, V. T.; NG, M. M.; TOH, C.-S. Electrochemical impedance spectroscopy characterization of nanoporous alumina dengue virus biosensor. **Bioelectrochemistry**, v. 88, p. 15-21, 2012.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; DE FILIPPIS, A. M. B.; PEREIRA, M. A. S.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.

NUNES, G. S.; JEANTY, G.; MARTY, J.-L. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides: Comparative study. **Analytica chimica acta**, v. 523, n. 1, p. 107-115, 2004.

OLIVEIRA, J.; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L.; MATTOSO, L.; MEDEIROS, E. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 8, p. 1-11, 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Informação Geral: Dengue. 2017. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4493%3A2010-informacion-general-dengue&catid=901%3Adengue-content&Itemid=40232&lang=en. Acesso em: 18 de maio de 2017.

ORGANIZATION, W. H. Executive committee of the directing council the regional committee Pan American World Health 120th Meeting CE120/21. **Geneva: WHO**, 1997.

_____. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. World Health Organization, 2009. ISBN 9241547871.

PEH, A. E. K.; LI, S. F. Y. Dengue virus detection using impedance measured across nanoporous aluminamembrane. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 42, p. 391-396, 2013.

PESSOA, S. M. Dengue Antígeno NS1: Uma Nova Abordagem Diagnóstica. **IPAC Medicina Diagnóstica**, 2012.

RAMANAVICIUS, A.; GENYS, P.; RAMANAVICIENE, A. Electrochemical impedance spectroscopy based evaluation of 1, 10-Phenanthroline-5, 6-dione and glucose oxidase modified graphite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 146, p. 659-665, 2014.

RIBAS-SILVA, R. C.; EID, A. A. Dengue antibodies in blood donors. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 34, n. 3, p. 193-195, 2012.

RICCARDI, C. D. S.; COSTA, P. I. D.; YAMANAKA, H. Amperometric immunosensor. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, 2002.

RICCI, F.; PALLESCHI, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 3, p. 389-407, 2005.

RIVETZ, B.; SIMAN-TOV, D.; AMBAL, E.; JARAMILLO, A.-C.; BEN-ZVI, A.; TARTAKOVSKY, B.; FISH, F. New dengue antibody assay with unique differential detection of IgG and IgM antibodies. **Clinical biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 180-184, 2009.

RODRIGUES, L. P.; FERREIRA, D. C.; FERREIRA, L. F.; CUADROS-ORELLANA, S.; DE OLIVEIRA, G. C.; BRITO-MADURRO, A. G.; DE OLIVEIRA, R. J.; ABRAHÃO, O.; MADURRO, J. M. Electropolymerization of hydroxyphenylacetic acid isomers and the development of a bioelectrode for the diagnosis of bacterial meningitis. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 45, n. 12, p. 1277-1287, 2015.

RODRIGUES, L. P.; FERREIRA, L. F.; MONTE, A. F. G. D.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Bioelectrode Applied to Diagnosis of Cardiac Disease. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 9, p. 6528-6538, 2014.

SADKI, S.; SCHOTTLAND, P.; BRODIE, N.; SABOURAUD, G. The mechanisms of pyrrole electropolymerization. **Chemical Society Reviews**, v. 29, n. 5, p. 283-293, 2000.

SANTOS, S. L. D. **Abordagem ecossistêmica aplicada ao controle da Dengue no nível local: um enfoque com base na reprodução social**. 2009. 231 p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

SANTOS, S. L. D.; AUGUSTO, L. G. D. S. Multidimensional model for dengue control: a proposal based on social reproduction and risk situations. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 21, n. 1, p. 177-196, 2011.

SCATURRO, P.; CORTESE, M.; CHATEL-CHAIX, L.; FISCHL, W.; BARTENSCHLAGER, R. Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 11, p. e1005277, 2015.

SCHATZMAYR, H. G. Dengue situation in Brazil by year 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 179-181, 2000.

SETHI, R. S. Transducer aspects of biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 9, n. 3, p. 243-264, 1994.

SHU, P.-Y.; YANG, C.-F.; KAO, J.-F.; SU, C.-L.; CHANG, S.-F.; LIN, C.-C.; YANG, W.-C.; SHIH, H.; YANG, S.-Y.; WU, P.-F. Application of the dengue virus NS1 antigen rapid test for on-site detection of imported dengue cases at airports. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 4, p. 589-591, 2009.

SILVA; CAVALCANTI, I. T.; SILVA, M. M.; DUTRA, R. F. A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. **Talanta**, v. 117, p. 431-437, 2013.

SILVA; SILVA, S. J. D. S.; ROCCO, I. M.; SILVEIRA, V. R.; SUZUKI, A.; KATZ, G.; BISORDI, I. Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue-São Paulo. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 8, n. 91, p. 14-26, 2011.

SILVA, M. M. S.; DIAS, A. C. M. S.; CORDEIRO, M. T.; MARQUES JR, E.; GOULART, M. O. F.; DUTRA, R. F. A thiophene-modified screen printed electrode for detection of dengue virus NS1 protein. **Talanta**, v. 128, p. 505-510, 2014.

SILVA, T. A. R.; FERREIRA, L. F.; SOUZA, L. M.; GOULART, L. R.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid). **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 539-545, 2009.

SINAWANG, PRIMA D.; RAI, V.; IONESCU, R. E.; MARKS, R. S. Electrochemical lateral flow immunosensor for detection and quantification of dengue NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 400-408, 2016.

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions. **International journal of nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 433, 2006.

SOUZA. **Desenvolvimento de biossensores para detecção de infecções virais baseados em eletrodos quimicamente modificados**. 2014. 125 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2014.

SOUZA; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 875, 1999.

SOUZA, L. J. D. **Dengue—diagnóstico, tratamento e prevenção**. Editora Rubio, 2008. ISBN 8577710254.

SRIVASTAVA, A.; O'CONNOR, I. B.; PANDIT, A.; WALL, J. G. Polymer-antibody fragment conjugates for biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 2, p. 308-329, 2014.

SULEMAN, M.; FARYAL, R.; ALAM, M. M.; SHARIF, S.; SHAUKAT, S.; AAMIR, U. B.; KHURSHID, A.; ANGEZ, M.; UMAIR, M.; SUFIAN, M. M. NS1 antigen: A new beam of light in the early diagnosis of dengue infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 12, p. 1212-1214, 2016.

TAI, D.-F.; LIN, C.-Y.; WU, T.-Z.; HUANG, J.-H.; SHU, P.-Y. Artificial receptors in serologic tests for the early diagnosis of dengue virus infection. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 1486-1491, 2006.

VIEIRA, S. N. Desenvolvimento e caracterização de um novo material polimérico para aplicação em biossensores eletroquímicos na detecção de derivados fenólicos. 2011.

VO-DINH, T.; CULLUM, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 366, n. 6, p. 540-551, 2000.

WANG, Y.; XU, H.; ZHANG, J.; LI, G. Electrochemical sensors for clinic analysis. **Sensors**, v. 8, n. 4, p. 2043-2081, 2008.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.

WONG, W. R.; KRUPIN, O.; SEKARAN, S. D.; MAHAMAD ADIKAN, F. R.; BERINI, P. Serological diagnosis of dengue infection in blood plasma using long-range surface plasmon waveguides. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 3, p. 1735-1743, 2014.

WU, T.-Z.; SU, C.-C.; CHEN, L.-K.; YANG, H.-H.; TAI, D.-F.; PENG, K.-C. Piezoelectric immunochip for the detection of dengue fever in viremia phase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 5, p. 689-695, 2005.

YAMADA, K.-I.; TAKASAKI, T.; NAWA, M.; KURANE, I. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 24, n. 3, p. 203-209, 2002.

YANG, J.; WANG, X.; SHI, H. An electrochemical DNA biosensor for highly sensitive detection of phosphinothricin acetyltransferase gene sequence based on polyaniline-(mesoporous nanozirconia)/poly-tyrosine film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 162, n. 1, p. 178-183, 2012.

ZAINAH, S.; WAHAB, A. A.; MARIAM, M.; FAUZIAH, M.; KHAIRUL, A.; ROSLINA, I.; SAIRULAKHMA, A.; KADIMON, S.; JAIS, M. M.; CHUA, K. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. **Journal of virological methods**, v. 155, n. 2, p. 157-160, 2009.

ZAYTSEVA, N. V.; MONTAGNA, R. A.; BAEUMNER, A. J. Microfluidic biosensor for the serotype-specific detection of dengue virus RNA. **Analytical chemistry**, v. 77, n. 23, p. 7520-7527, 2005.

ZHANG, H.; XIE, Y.; LIU, Z.; TAO, R.; SUN, Z.; DING, K.; AN, G. p-Aminophenylacetic acid-mediated synthesis of monodispersed titanium oxide hybrid microspheres in ethanol solution. **Journal of colloid and interface science**, v. 338, n. 2, p. 468-473, 2009.

ZHANG, S.; WRIGHT, G.; YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 5, p. 273-282, 2000.

ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. **Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications**. Academic Press, 2011. ISBN 008055489X.

ZHU, X.; YURI, I.; GAN, X.; SUZUKI, I.; LI, G. Electrochemical study of the effect of nano-zinc oxide on microperoxidase and its application to more sensitive hydrogen peroxide biosensor preparation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 8, p. 1600-1604, 2007.